

Dissertation

**Untersuchungen zum Einkapseln von Sprosssegmenten für die
Verwendung als künstliche Samen am Beispiel
von Chrysanthemen und Rosen**

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum horticultrarum
(Dr. rer. hort.)**

**eingereicht an der
Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin**

von
M. Sc., Sayed Shehata Abdin Abdel-Rahman
geb. am 24.05.1966 in Assiut, Ägypten

Präsident
der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der
Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät:
Prof. Dr. Uwe Jens Nagel

Gutachter 1. Prof. Dr. G. H. Kaufmann
 2. Doz. Dr. K. Zoglauer
 3. Dr. I. Pinker

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2003

Meinen Eltern, meiner Frau,
und meinen Kindern

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Abgest.	Abgestorben
BAP	N ⁶ -Benzylaminopurin
cv.	Sorte
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
FG	Fachgebiet
FM	Frischmasse
GA ₃	Gibberellinsäure
GWH	Gewächshaus
h	Stunde
Horm.	Hormone
IES	Indol-3-essigsäure
IBS	Indol-3-buttersäure
Kont.	Kontrolle
Lagertemp.	Lagertemperatur
Lepoivre	Medium nach QUOIRIN & LEPOIVRE (1977)
M	Molar
Med.	Medium
mM	Millimolar
MS	Nährmedium nach MURASHIGE & SKOOG (1962)
Na-Alginat	Natrium-Alginat
NES	1-Naphthylelessigsäure
n.s.	nicht signifikant
Keim.	Keimung
Kin.	Kinetin
Komp.	Komponenten
Konz.	Konzentration
k. S.	künstlicher Samen
R. Temp.	Raumtemperatur
S.	Seite

Sacc.	Saccharose
SE	Somatische Embryonen
Sec.	Sekunde
Tab.	Tabelle
TISAB	Probenkonditionierlösung
TM	Trockenmasse
vgl.	vergleiche
Vit.	Vitamine
Vital.	Vitalität
W.	Wasser
WG	Wassergehalt
Wo.	Woche
WPM	Medium nach LLOYD & MC COWN (1980)
ZE	Zygotische Embryonen
ZTemp.	Zimmertemperatur
%	Prozent

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

1	Einleitung	1
1.1	Künstliche Samen und ihre wirtschaftliche Bedeutung	1
1.2	Botanik und wirtschaftliche Bedeutung von Chrysanthemen und Rosen	4
1.2.1	Chrysanthemen	4
1.2.2	Rosen	7
2	Kenntnisstand zur Entwicklung künstlicher Samen	10
2.1	Künstliches Saatgut	10
2.1.1	Qualität des Pflanzenmaterials	11
2.1.2	Künstliches Endosperm	13
2.1.2.1	Gelmatrix	13
2.1.2.2	Gelmatrixkomponenten	17
2.1.2.2.1	Nährstoffe	17
2.1.2.2.2	Wachstumsregulatoren	19
2.1.3	Samenschale	21
2.2	Methoden der Einkapselung	21
2.3	Methoden der Sterilisation	24
2.4	Konversionssubstrate	24
2.5	Konversion der künstlichen Samen unter unsterilen Bedingungen	25
2.6	Einkapselung von Nodiensegmenten aus dem Gewächshaus	26
2.7	Lagerung der künstlichen Samen	27
2.7.1	Lagerung bei niedrigen Temperaturen (über 0°C)	27
2.7.2	Kryokonservierung	29
3	Hauptziele der Untersuchungen	37
4	Versuchsmaterial und Untersuchungsmethoden	38
4.1	Materialbeschreibung	38
4.1.1	<i>Dendranthema x grandiflorum</i> KITAM.	38
4.1.2	<i>Rosa hybrida</i> 'Kardinal'	40
4.2	Anzucht des Pflanzenmaterials	40
4.3	Allgemeine Kulturbedingungen im Wachstumsraum und im Gewächshaus	41
4.4	Die Einkapselungsmethode	41
4.5	Datenerhebung und Auswertung	42

4.6	Versuchsdurchführung	43
4.6.1	Qualität des Pflanzenmaterials	44
4.6.1.1	Einfluss der Subkulturdauer	44
4.6.1.2	Einfluss der Position der Explantate am Spross	44
4.6.1.3	Konversion eingekapselter Nodiensegmente	45
4.6.2	Entwicklung der Kapsel-Zusammensetzung für <i>Dendranthema</i>	45
4.6.2.1	Einfluss der Na-Alginatkonzentration	45
4.6.2.2	Einfluss der Nährstoffe	46
4.6.2.3	Einfluss von Wachstumsregulatoren	47
4.6.2.4	Übertragung der Ergebnisse auf weitere <i>Dendranthema</i> -Sorten	48
4.6.3	Entwicklung der Kapsel-Zusammensetzung für <i>Rosa</i>	48
4.6.3.1	Einfluss von Wachstumsregulatoren	48
4.6.3.2	Einfluss der Saccharosekonzentration	49
4.6.3.3	Einfluss der Kapselgröße	49
4.6.3.4	Verbesserung der Konversion der künstlichen Samen von <i>Rosa</i>	50
4.6.4	Einfluss des Substrates auf die Konversion unter sterilen Bedingungen	50
4.6.5	Einfluss einer zweiten Kapselschicht auf die Konversion	51
4.6.6	Konversion der künstlichen Samen unter unsterilen Bedingungen	52
4.6.7	Einkapselung von Nodiensegmenten aus dem Gewächshaus	52
4.6.7.1	Einfluss der Gelmatrixkomponenten	52
4.6.7.2	Übertragung der Ergebnisse auf andere <i>Dendranthema</i> -Sorten	52
4.6.8	Lagerung der künstlichen Samen	53
4.6.8.1	Lagerung bei niedrigen Temperaturen (über 0°C)	53
4.6.8.2	Kryokonservierung (Einkapselung-Dehydrierung)	53
5	Ergebnisse	56
5.1	Qualität des Pflanzenmaterials	56
5.1.1	Einfluss der Subkulturdauer	56
5.1.2	Einfluss der Position der Explantate am Spross	57
5.1.3	Konversion eingekapselter Nodiensegmente	59
5.2	Entwicklung der Kapsel-Zusammensetzung für <i>Dendranthema</i>	60
5.2.1	Einfluss der Na-Alginatkonzentration	60
5.2.2	Einfluss der Nährstoffe	61
5.2.3	Einfluss von Wachstumsregulatoren	64
5.2.4	Übertragung der Ergebnisse auf weitere <i>Dendranthema</i> -Sorten	66

5.2.5	Einfluss der Wachstumsregulatoren.....	68
5.2.6	Einfluss der Saccharosekonzentration.....	69
5.2.7	Einfluss der Kapselgröße	71
5.2.8	Verbesserung der Konversion der künstlichen Samen von <i>Rosa</i>	72
5.3	Einfluss des Substrates auf die Konversion unter sterilen Bedingungen.....	74
5.4	Entwicklung einer Samenschale für unsterile Bedingungen.....	77
5.5	Einkapselung von Nodiensegmenten aus dem Gewächshaus	81
5.5.1	Einfluss der Gelmatrixkomponenten.....	81
5.5.2	Übertragung der Ergebnisse auf andere <i>Dendranthema</i> -Sorten	83
5.6	Lagerung der künstlichen Samen	85
5.6.1	Lagerung bei niedrigen Temperaturen über 0°C.....	85
5.6.2	Lagerung durch die Kryokonservierung (Einkapselung-Dehydrierung)	88
6	Diskussion und Schlussfolgerungen.....	91
6.1	Zum erreichten wissenschaftlichen Stand und Schlussfolgerungen für die weitere Bearbeitung	91
6.1.1	Bewertung der wesentlichen Ergebnisse.....	91
6.1.2	Charakteristik der Grundlösungen	94
6.1.3	Der wissenschaftliche Neuwert der eigenen Untersuchungen	108
6.1.4	Vorschläge für die Weiterführung der Forschungsarbeiten	113
6.2	Schlussfolgerungen für erste praktische Anwendungen	114
7	Zusammenfassung.....	118
8.	Literaturverzeichnis.....	121

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabellenanhang

1 Einleitung

1.1 Künstliche Samen und ihre wirtschaftliche Bedeutung

Mit der besseren Beherrschung der Methoden zur Erzeugung somatischer Embryonen entstand auch der Wunsch, diese somatischen Embryonen durch ein Endosperm und eine Samenschale zu ergänzen und zu schützen, also letztendlich „künstliche Samen“ (synseeds, synthetic seeds, artificial seeds) zu entwickeln. 1977 präsentierten MURASHIGE *et al.* erstmals diese Idee zur Umhüllung somatischer Embryonen auf einem Kongress in Brüssel. Inzwischen ist der Begriff „künstlicher Samen“ erweitert worden und man versteht nun darunter somatische Embryonen, Sprossspitzen, Sprosssegmente oder andere vegetative Organe, die eingekapselt werden (BAPAT, 1993; AITKEN-CHRISTIE *et al.*, 1995; PICCIONI & STANDARDI, 1995; REPUNTE *et al.*, 1996; STANDARDI & PICCIONI, 1996; PICCIONI, 1997). Im künstlichen Samen versucht man, den Aufbau des natürlichen Samens nachzuvollziehen (Abb. 1). Er besteht aus einem Pflanzenteil (somatischer Embryo, Nodiensegment oder Protocorm), einer Kapsel, dem künstlichen Endosperm, und eventuell aus einer zweiten Hülle, der "Samenschale".

Der natürliche Samen besteht vergleichsweise aus dem Embryo, der im Endosperm eingebettet ist, und einer Samenschale. Alle zur Keimung und zur Entwicklung des Sämlings notwendigen Nährstoffe sind im Samen enthalten. Diese Nährstoffe sind entweder im Endosperm (wie bei *Magnolia spp.*, *Oryza sativa*, *Fatsia japonica*, *Ilex spp.*, *Dicentra canadensis*, *Delphinium ajacis*, *Papaver spp.*) oder im Embryo selbst (bei *Vicia faba*, *Arachis hypogaea*, *Cucumis sativus*) gespeichert. Die physiologischen Vorgänge bei der Samenkeimung sind komplexer Art. Phytohormone spielen bei der Regulation der Dormanz und Keimung des Samens eine wichtige Rolle. Besondere Beachtung verdient die Schale des natürlichen Samens, die vor Austrocknung und Befall durch Mikroorganismen schützt. In der Zeit vor und während der Keimung verändern sich die Eigenschaften der Schale, wodurch die Wasseraufnahme und das Auswachsen des Sämlings ermöglicht werden.

Die bisher beschriebenen experimentellen Ansätze zur Entwicklung künstlicher Samen stehen noch ganz am Anfang, wenn man daran denkt, den natürlichen Samen "nachzubauen".

Es gibt trotzdem einige ermutigende Berichte über die erfolgreiche Einkapselung von Embryonen und Nodiensegmenten.

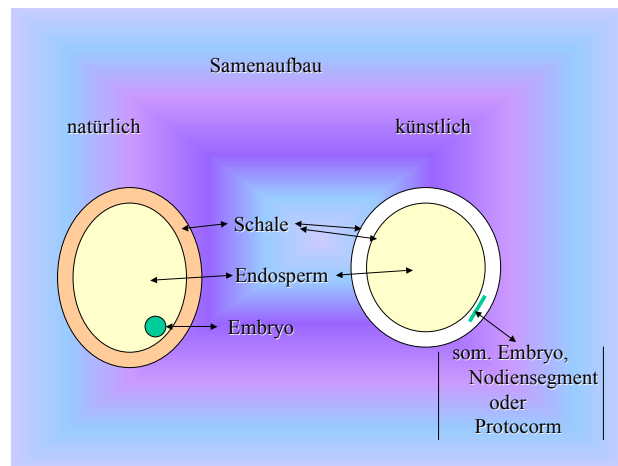


Abb. 1: Vergleich des Aufbaus natürlicher und künstlicher Samen. Es wäre sinnvoll eine Zwei-Schicht-Kapsel für die Produktion künstlicher Samen zu verwenden.

Durch die Entwicklung solcher künstlicher Samen könnten sich folgende Vorteile ergeben:

- a. Die Vorzüge der vegetativen Vermehrung (muttergleiche Nachkommenschaften) lassen sich mit den Vorzügen der Vermehrung durch Samen (einfache und preiswerte Handhabung) im großen Maßstab verbinden.
- b. Die vegetative Massenvermehrung wird preiswerter im Vergleich zur herkömmlichen Mikrovermehrung, wenn mit somatischen Embryonen gearbeitet wird (REDENBAUGH *et al.*, 1988; SAJINA *et al.*, 1997).
- c. Die Vermehrung von seltenen Hybriden, Eliten-Genotypen und transformierten Pflanzen (PADMAJA *et al.*, 1995) kann erleichtert werden.
- d. Die Einkapselung des Pflanzenmaterials erleichtert den Austausch von Sprosskulturen zwischen den Laboren (REDENBAUGH *et al.*, 1988), da weniger Raum benötigt wird und das Pflanzenmaterial eventuell besser geschützt ist.
- e. Die Alginat-Einkapselungstechnik kann die Techniken zur Erhaltung der genetischen Ressourcen (Germplasmkonservierung) ergänzen und verbessern (FABRE & DEREUDDRE, 1990; SAJINA *et al.*, 1997; BALLESTER *et al.*, 1997; MARUYAMA *et al.*, 1997).

- f. Durch die Einkapselung von Knospen aus dem Freiland (PATTNAIK *et al.*, 1995) oder dem Gewächshaus kann schnell eine vegetative Vermehrung in kleinerem Umfang durchgeführt werden bzw. das Pflanzenmaterial gelagert werden.
- g. Die Einkapselung liefert einen physikalischen Schutz für das Pflanzenmaterial und enthält auch Nährstoffe, Wachstumsregulatoren, Antibiotika und Fungizide usw., die während der Vermehrung benötigt werden (PADMAJA *et al.*, 1995; JAYASREE *et al.*, 1997).
- h. Pflanzenschutzmittel können über die Kapsel appliziert werden und so direkt auf das Pflanzenmaterial einwirken. Dadurch kann sich der Gesundheitsstatus der Pflanzen verbessern (BAPAT *et al.*, 1987; SHARMA *et al.*, 1994).

Erste Untersuchungen zur Einkapselung wurden mit *Medicago sativa* L. (BINGHAM *et al.*, 1975) sowie *Apium graveolens* L. und *Lactuca sativa* L. (LAWRENCE, 1981) durchgeführt. Die Überlebensfähigkeit der künstlichen Samen in diesen Versuchen war jedoch sehr niedrig. LAWRENCE (1981) verwendete die sogenannte flüssige Aussaattechnologie. Die Embryonen wurden zunächst mit Polyoxyethylen umhüllt, aber nur wenige Embryonen überstanden den Stress der Umhüllung und der Austrocknung. Inzwischen gibt es zahlreiche Berichte über die erfolgreiche Einkapselung hydrierter oder getrockneter Embryonen und anderer Gewebe. Als Beispiele seien genannt: *Apium graveolens* L., *Brassica spp.*, *Daucus carota* L., *Gossypium hirsutum* L., *Lactuca sativa* L., *Medicago sativa* L., *Oryza sativa* L. und *Zea mays* L. (REDENBAUGH *et al.*, 1991).

Einige Beispiele sollen zeigen, bei welchen Pflanzen sich Vorteile durch die Verwendung der künstlichen Samen ergeben könnten (Tab. 1).

Tab. (1): Anwendungsfelder für künstliche Samen (FUJII *et al.*, 1987).

Art	Anwendung
<i>Oryza sativa</i> L.	Schnelle Vermehrung von F1 Hybriden
<i>Solanum tuberosum</i>	Bessere Lagerfähigkeit des Pflanzgutes unter tropischen Bedingungen
<i>Pelargonium spp.</i>	Preissenkung in der vegetativen Vermehrung
<i>Cucumis sativus</i>	Vegetative Vermehrung
<i>Allium sativum</i> L.	Vermehrung virusfreier und nematodenfreier Pflanzen
<i>Gerbera spp.</i>	Senkung der Kosten bei der Samenproduktion

1.2 Botanik und wirtschaftliche Bedeutung von Chrysanthemen und Rosen

1.2.1 Chrysanthemen

Die alte Großgattung „*Chrysanthemum*“, Familie *Asteraceae*, umfasste ca. 200 Arten, die vorwiegend auf der Nordhalbkugel, besonders im Mittelmeerraum und Vorderasien, aber auch in Südafrika vorkommen (HORN & LANGE, in HORN, 1996).

Diese Gattung wird neuerdings in 14 Gattungen aufgeteilt, darunter *Argyranthemum* WEBB, *Chrysanthemum* L., *Coleostephus* CASS., *Dendranthema** DES MOUL., *Hymenostemma* WILLK., *Ismelia* CASS., *Leucanthemum* MILL. und *Tanacetum* L (SORENG & COPE, 1991 in HORN, 1996). In der Literatur werden beide Synonyme noch verwendet. In dieser Arbeit wird mit der modernen Nomenklatur gearbeitet.

Tab. (2): Einteilung der wichtigsten „*Chrysanthemum*“-Arten (SORENG & COPE, 1991 in HORN, 1996).

1. Winterharte Arten	2. Einjährige, nicht winterharte Arten	2. Einjährig in Gewächshäusern kultivierte Arten
<ul style="list-style-type: none"> - <i>C. arcticum</i> - <i>Dendranthema arct.**</i> - <i>C. cinerariifolium</i> - <i>Pyrethrum cin.*</i> - <i>Tanacetum cin.**</i> - <i>C. coccineum</i> - <i>Pyrethrum roseum*</i> - <i>Tanacetum cocc.**</i> - <i>C. corymbosum</i> - <i>Pyrethrum cor.*</i> - <i>Tanacetum cor.**</i> - <i>C. leucanthemum</i> - <i>Leucanthemum vulgare**</i> - <i>C. maximum</i> - <i>Leucanthemum max.**</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>C. carinatum</i> - <i>Ismelia car.**</i> - <i>C. coronarium</i> - <i>C. frutescens</i> - <i>Argyranthemum frut.**</i> - <i>C. multicaule</i> - <i>Coleostephus mult.**</i> - <i>C. paludosum</i> - <i>Hymenostemma pal.**</i> - <i>C. parthenium</i> - <i>Matricaria p.*</i> - <i>Tanacetum p.**</i> - <i>C. ptarmiciflorum</i> - <i>Tanacetum pt.**</i> - <i>C. segetum</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Chrysanthemum-Indicum-Hybriden</i> - <i>C. x morifolium*</i> - <i>Dendranthema x grandiflorum**</i>

* = synonym alt, ** = synonym neu

*Die Gattung *Dendranthema* ist angeblich neuerdings in die Kleingattung *Chrysanthemum* eingegliedert worden (SORENG & COPE, 1991 in HORN, 1996). Begründungen wurden hierfür bisher nicht angegeben und sind damit auch nicht nachvollziehbar (Das Magazin für Zierpflanzenbau, 2002).

Die verschiedenen Arten von *Chrysanthemum* werden aus praktischen Gründen in drei Gruppen (Tab. 2, nach SORENG & COPE, 1991) gegliedert:

- a. Winterharte Arten, die als Stauden für Schmuck- oder Schnitzzwecke angebaut und nur im Freiland, meist mehrjährig, kultiviert werden.
- b. Nicht winterharte Arten, die nur als Sommerblumen im Freiland für Rabatten oder zum Schnitt verwendet werden.
- c. Nicht ausreichend winterharte Topf- oder Schnittblumen, die in Gewächshäusern angebaut werden.

Eine besondere Bedeutung für den Gartenbau besitzen Sorten von *Dendranthema x grandiflorum* KITAM. (alt: *Chrysanthemum x morifolium* RAMAT.), welche einjährig im Gewächshaus kultiviert werden und aus Kreuzungen *Dendranthema indicum* DESMOUL. und *D. weyrichii* (MAXIM) TZELEV, *D. zawadskii* (HERBICH) AELEV hervorgegangen sind. In China beheimatet, kamen *Dendranthema*-Sorten schon um 750 als Kulturformen nach Japan und ab 1789 nach Europa (HORN und LANGE, in HORN, 1996). Bis heute wird die Züchtung weltweit betrieben und die Sortenvielfalt ist groß. Die Chromosomengrundzahl von *Dendranthema x grandiflorum* ist $2n = 6x = 54$ Chromosomen, wobei Aneuploidie nicht selten ist. Untersuchungen zur Vererbung wurden u.a. von de JONG (1984) durchgeführt.

Die Kulturführung im geschützten Anbau wird vor allem über Tageslänge und Temperatur gesteuert.

Für die vegetative Entwicklung ist ausreichend Licht erforderlich, weil *Dendranthema* zu den lichtbedürftigen Pflanzen zählen. Da in den Herbst- und Wintermonaten aufgrund der kürzeren Tage weniger Licht zur Verfügung steht, ist die vegetative Entwicklung langsamer und damit die Kulturzeit bis zur Blühinduktion länger.

Die Abhängigkeit der Blütenbildung von der Tageslänge wurde vor ca. 70 Jahren in den USA entdeckt und seitdem können *Dendranthema* ganzjährig kultiviert werden (GARNER & ALLARD, 1920). Die *Dendranthema x grandiflorum*-Sorten gehören überwiegend zu den Kurztagspflanzen und werden für die gesteuerte Kultur in Wochengruppen eingeteilt. Eine Sorte der 6-Wochen-Gruppe benötigt unter den für sie optimalen Bedingungen von Kurztagseinsatz bis zur Blüte sechs Wochen. Entsprechend gibt es eine 9-Wochen-Gruppe, zu der heute die meisten Sorten gehören, und noch einige wenige 11- bis 14-Wochen-Sorten.

Auch die Temperatur übt oft im Zusammenspiel mit der Tagelänge einen Einfluss auf die Blütenbildung aus. Es gibt nach Untersuchungen in den USA für die Blütenbildung drei Sortengruppen hinsichtlich der Reaktion auf die Temperatur (VOGELMANN, 1969):

- a. Thermoneutrale Sorten, bei denen Blütenbildung und –entwicklung im Bereich von 10-27°C stattfinden, die aber bei 16°C die beste und schnellste Entwicklung zeigen.
- b. Thermopositive Sorten, die mindestens 16°C für die generative Phase benötigen und bei denen höhere Temperaturen bis 25°C zu keiner Beeinträchtigung führen.
- c. Thermonegative Sorten, bei denen im Bereich von 10 bis 15°C die Knospen gut ausgebildet werden, die aber bei Temperaturen über 16°C sehr empfindlich sind, vor allem im späteren Stadium der Knospenentwicklung.

Alle Sortengruppen haben die beste Entwicklung um 16°C, die daher als Standardtemperatur für den gesteuerten Anbau genutzt wird.

Dendranthema werden mit verschiedenen Methoden vermehrt (Samen, Stecklinge, Ableger „Offshoot“ und In-vitro-Kultur). Die Samenvermehrung wird nur in den Züchtungsprogrammen benutzt. Am häufigsten werden die Sorten durch Stecklinge vermehrt. Die In-vitro-Kultur ermöglicht die Mikrovermehrung (EARLE & LANGHANS, 1974; ROEST & BOKELMANN, 1975; AHMED & ANDREA, 1987) und erleichtert neue Ansätze in der Züchtung. Für die Züchtung wurde u.a. mit Protoplastenkulturen (SCHUM & PREIL, 1981; OTSUKA *et al.*, 1985) und Kalluskulturen (HILL, 1968; BUSH *et al.*, 1976; SUTTER & LANGHANS, 1981) gearbeitet. Es gibt einige Untersuchungen zur Vermehrung von *Dendranthema* durch die somatischen Embryonen. Somatische Embryogenese kann direkt ohne Kallusbildung und indirekt nach der Kallusbildung ausgelöst werden. Die Induktion der somatischen Embryonen und embryoähnlicher Strukturen ist bei *Dendranthema* sehr schwierig (MAY & TRIGIANO, 1991; PAVINGEROVA *et al.*, 1994; SHINOYAMA *et al.*, 1997). MAY & TRIGIANO (1991) und PAVINGEROVA *et al.* (1994) hatten Embryogenese an *Dendranthema*-Blättern induziert, aber die Form der Embryonen war abnormal. SHINOYAMA *et al.* (1997) berichteten über das Aussehen der embryoähnlichen Strukturen aus *Dendranthema*-Blättern. TANAKA *et al.* (2000) zeigten, dass sich aus den Strahlblüten (Blütenblätter „ray floret“) von *Dendranthema* somatische Embryonen bildeten, die morphologisch normal erschienen.

Die indirekte Bildung von somatischen Embryonen über eine Kallusphase führt meist zu einer zunehmenden Anzahl an Mutationen oder Chimären werden entmischt. Da im Kallus

vermehrt polyploide oder aneuploide Zellen auftreten, kann auch die Anzahl veränderter Regenerate zunehmen. Die Mikrovermehrungsmethoden, die Achselsprosse oder Sprossspitzen verwenden, sind genetisch und histologisch stabiler. Aus diesem Grund werden Achselsprosse oder Sprossspitzen für die kommerzielle Mikrovermehrung empfohlen (HARTMANN *et al.*, 1997).

Die wirtschaftliche Bedeutung der kultivierten *Dendranthema*-Sorten ist sehr groß. Sie gehören weltweit mit *Rosa* und *Dianthus* zu den wichtigsten Schnittblumen. So wurden von den *Dendranthema*-Sorten allein in den Niederlanden 1990 mehr als eine Milliarde Stiele (Rang 2) und 21 Millionen Töpfe produziert. Im benachbarten Dänemark wurden 1992 etwa 17 Millionen Töpfe produziert (Rang 5-6 nach dem Umsatz) und zu 75% nach Deutschland exportiert. In Deutschland gab es 1988 etwa 470 ha für die Produktion von *Dendranthema*-Schnittblumen und 18 Millionen Topfpflanzen wurden produziert. *Dendranthema x grandiflorum*-Sorten gehören zu den wichtigsten Schnittblumen und Topfpflanzen, die in vielen Teilen der Welt angebaut werden (ROUT & DAS, 1997). In Japan werden die *Dendranthema*-Blumen für Schmuckzwecke genutzt. Auch im arabischen Raum (z.B. Ägypten) ist die wirtschaftliche Bedeutung von *Dendranthema* sehr groß, da die *Dendranthema* eine von den wichtigsten Schnittblumen und Topfpflanzen ist. In Ägypten wird *Dendranthema x grandiflorum* im Freiland und in Gewächshäusern kultiviert. Die *Dendranthema*-Schnittblumen sind im arabischen Raum teuer, weil sie als Kurztagspflanzen im Herbst blühen und nur wenige andere Schnittblumen im Herbst angeboten werden. Ägypten exportiert *Dendranthema*-Schnittblumen vor allem nach Europa.

1.2.2 Rosen

Die Familie *Rosaceae* umfasst etwa 100 Gattungen mit mehr als 2000 Arten von Kräutern, Sträuchern oder Bäumen, die vor allem auf der nördlichen Halbkugel vorkommen. Diese Familie ist in Unterfamilien gegliedert (*Rosoideae*, *Spiraeoideae*, *Maloideae* und *Prunoideae*). Die Gattung *Rosa* (Unterfamilie *Rosoideae*) kommt mit etwa 120 Arten in der nördlichen gemäßigten und subtropischen Zone vor und ist in vier Untergattungen (*Eurosa*, *Hesperhodos*, *Hulthemia* und *Platyrhodon*) gegliedert (WYLIE, 1954). Die Untergattung *Eurosa* wird in 10 Sektionen unterteilt. Für die Entwicklung der Gartenrosen (Teehybriden) sind folgende Sektionen und Arten von Bedeutung: Gallicanae (*R. gallica* L. Süd- und

Mitteleuropa, *R. x damascena* MILL., eine alte europäische und mediterrane Kulturrese); Pimpinellifoliae (*R. foetida* J. HERRM. Iran bis NW-Himalaja); Synstylae (*R. multiflora* THUNB. Ostasien, *R. moschata* J. HERRM. Iran bis Himalaja, Äthiopien) sowie Chinenses (*R. chinensis* JACQ. China). Aus der Sektion Caninae kommen die heimischen Hundsrosen (*R. canina* L.), welche wichtige Unterlagen liefern (HORN & LANGE, in HORN, 1996).

Die heutigen Gartenrosen (Teehybriden), einschließlich der Schnitt-Sorten, entstanden seit Anfang des 19. Jahrhunderts aus Kreuzungen der genannten, einmal-blühenden, tetraploiden ($2n = 28$) europäischen und westasiatischen Formen mit den mehrfachblühenden, diploiden ($2n = 14$) ostasiatischen Arten (WYLIE, 1954). Die derzeitigen Sorten sind tetraploid. Die Topfrosen sind di- oder tetraploid; sie wurden aus *R. chinensis* „Minima“ und Kreuzungen dieser Art mit *R. multiflora* und möglicherweise weiteren Zwergmutanten alter Sorten entwickelt.

Rosen-Pflanzen werden durch verschiedene Methoden erzeugt (Samen, Stecklinge, Wurzelabschnitte, Tribspitzen, Veredelungen, Okulationen und In-vitro-Kultur). Die Vermehrung durch Samen wird in den Züchtungsprogrammen benutzt. Sie ist aber keine einfache Vermehrungsmethode, weil die Rosen-Samen eine Dormanzphase haben und sie meist stratifiziert werden müssen. Die bekannteste Vermehrungsmethode ist die Veredelung durch Okulation. Der Einsatz von In-vitro-Techniken in der Vermehrung von Rosen wird seit etwa 1979 mit Erfolg betrieben. Techniken für die Mikrovermehrung von Rosen sind von SKIRVIN *et al.* (1990); SHORT & ROBERTS (1991) und HORN (1992) entwickelt worden. Die Mikrovermehrung erlaubt den schnellen Aufbau von pathogenfreien Beständen von Unterlagen und Sorten (LEYHE & HORN, 1994).

Der Einfluss der Temperatur auf das Wachstum von Gewächshaus-Rosen wurde von zahlreichen Autoren untersucht, zuletzt von BERG (1980). Knospenaustrieb und Triebwachstum nach dem Rückschnitt und der Blütenbildung werden durch die Temperatur stark beeinflusst. Der Knospenaustrieb wird durch steigende Temperaturen gefördert, wobei es Unterschiede zwischen den Sorten gibt. Im Bereich zwischen 15°C und 22°C erfolgt der Knospenaustrieb um so schneller, je höher die Temperatur ist. Bei 25°C werden etwa drei, bei 10°C etwa 21 Tage bis zum Austrieb benötigt (HORN & LANGE, in HORN, 1996).

Rosen blühen am besten in der lichtreichen Jahreszeit. Wachstum und Entwicklung sind auch unter Gewächshausbedingungen deutlich von der Lichtstrahlung abhängig. Die Rose gehört zu den Tageslängen-unabhängig, autonom induzierenden Arten. Die Blütenfarben der Rosen werden durch Flavonoide und Carotinoide bedingt. Neben Carotinoiden enthalten weiße und gelbe Blüten nur die Flavonole Kaempferol und Quercetin, die anderen Farben dazu auch Pelargonidin- und Cyanidin-Glykoside. Untersuchungen zur Vererbung wichtiger Eigenschaften liegen kaum vor (DE VRIES & DUBOIS, 1984).

Die wirtschaftliche Bedeutung der kultivierten Rosen ist sehr groß. Sie gehören weltweit mit *Dendranthema* und *Dianthus* zu den wichtigsten Schnittblumen. Allein in der Bundesrepublik, Frankreich, England und in den Niederlanden werden jährlich mehr als 3,5 Milliarden Schnittrosen vermarktet. Gartenrosen- und Unterlagen-Anzucht wird in der Europäischen Union auf etwa 2000 ha betrieben. In der Bundesrepublik Deutschland werden in Baumschulen etwa 50 Millionen Unterlagen jährlich erzeugt. Erhebliche Mengen von Schnittrosen etwa 900 Millionen 1996, im Jahr 2000 waren 1,15 Milliarden Rosen in Deutschland Importe. Ca. 680 Millionen Rosen werden von überseeischen Ländern in die Länder der Europäischen Union importiert (HORN & LANGE, in HORN, 1996 und ZVG-Report, 2001). Im arabischen Raum ist die wirtschaftliche Bedeutung von Rosen auch sehr groß, da die Rosen mit *Dendranthema* und *Dianthus* zu den wichtigsten Schnittblumen gehören. Zum Beispiel in Ägypten werden die Rosen-Sorten im Freiland kultiviert und blühen das ganze Jahr, im Winter etwas schwächer. Ägypten exportiert Rosen-Schnittblumen in europäische und einige andere Länder.

2 Kenntnisstand zur Entwicklung künstlicher Samen

2.1 Künstliches Saatgut

Gegenwärtig wird die Einkapselungstechnik für die Produktion künstlicher Samen oder zur Vorbereitung der Kryokonservierung genutzt. Künstliche Samen (synthetische Samen, synseeds, synthetic seeds, artificial seeds) wurden von verschiedenen Autoren als eingekapselte somatische Embryonen, Sprossspitzen, Sprosssegmente, Zellaggregate oder andere Gewebe definiert, die für die Konversion unter In-vitro- oder Ex-vitro-Bedingungen verwendet werden können (BAPAT, 1993; AITKEN-CHRISTIE *et al.*, 1995; PICCIONI & STANDARDI, 1995; REPUNTE *et al.*, 1996; STANDARDI & PICCIONI, 1996; PICCIONI, 1997). In der ursprünglichen Definition war der somatische Embryo das einzige pflanzliche Teil, das für synthetische Samenproduktion genutzt wurde (REDENBAUGH, 1993; PICCIONI, 1997).

Die Entwicklung des eingekapselten Explantats wurde von verschiedenen Autoren als Konversion, Keimung oder Sprossbildung („Sprouting“) bezeichnet, d.h. verschiedene Begriffe wurden in der Literatur für diesen Prozess verwendet. Als **Konversion** charakterisierten ARRILLAGA *et al.* (1994), PADMAJA *et al.* (1995), BAZINET *et al.* (1997) und MAMIYA & SAKAMOTO (2001) den Prozess, bei dem sich aus dem künstlichen Samen Sprosse mit Wurzeln entwickelten. PADMAJA *et al.* (1995) verwendeten in der gleichen Publikation auch den Begriff **Keimung** für das Auswachsen von Spross und/oder Wurzelspitzen aus der Kapsel. ARA *et al.* (1999) bezeichneten die Entwicklung des eingekapselten Explantates ebenfalls als Keimung. MICHELI *et al.* (1998) definierten die **Sprossbildung (Sprouting)** als eine Zunahme in der Größe des Pflanzenmaterials mit einem Durchbrechen der Kapsel mit einem grünen Blatt bzw. Spross.

In dieser Arbeit wird der Begriff Konversion verwendet, wenn sich das eingekapselte Nodiensegment zu einer Pflanze mit Spross und Wurzeln entwickelt hat, ansonsten wird die Bildung von Spross oder Wurzeln getrennt ausgewiesen.

In den meisten Publikationen wurden somatische Embryonen zur Einkapselung verwendet. Vergleichsweise wenige Arbeiten findet man über die Einkapselung von Nodiensegmenten. Es gibt jedoch einige Gründe, sich mit der Einkapselung von Nodiensegmenten intensiver zu

befassen. Bisher sind nicht für alle Pflanzen reproduzierbare Arbeitsvorschriften für die Vermehrung durch somatische Embryonen verfügbar und es gibt noch zahlreiche Probleme bei der Steuerung der somatischen Embryogenese (PATTNAIK *et al.*, 1995). In der Literatur gibt es nur wenige Berichte zur Induktion somatischer Embryonen und embryoähnlicher Strukturen bei *Dendranthema* (MAY & TRIGIANO, 1991; PAVINGEROVA *et al.*, 1994; SHINOYAMA *et al.*, 1997). Sie berichteten, dass die Induktion somatischer Embryonen bei *Dendranthema* sehr schwierig ist. Es ist auch nicht ausgeschlossen, dass eine erhöhte somaklonale Variabilität bei der Bildung somatischer Embryonen auftritt (BUSH *et al.*, 1976; YOSHIDA, 1996; HARTMANN *et al.*, 1997; JALIGOT *et al.*, 2000) und damit eine sortenechte Vermehrung in Frage gestellt wird. Bei Sprosskulturen, die durch den Austrieb von Achselsprossen entstehen, wird von einer höheren genetischen Stabilität ausgegangen (MATHUR *et al.*, 1989; PATTNAIK *et al.*, 1995; YOSHIDA, 1996; HARTMANN *et al.*, 1997). Werden Sprossspitzen und Nodiensegmente von Sprosskulturen für die Einkapselung verwendet, ist deshalb mit einer geringeren Variabilität des Pflanzematerials zu rechnen. Das ist ein Vorteil, wenn Pflanzen, wie z.B. *Dendranthema*, die eine hohe Variabilität bzw. einen chimärischen Charakter aufweisen (BUSH *et al.*, 1976), sortenecht vermehrt oder erhalten werden sollen. Ein weiterer Grund könnte sein, dass auch Nodiensegmente aus dem Freiland oder aus dem Gewächshaus direkt einkapselt werden und dadurch die Phase der In-vitro-Kultur, die zu einer erhöhten Variabilität des Materials beitragen kann, umgangen wird (PATTNAIK *et al.*, 1995).

Die Einkapselung von Pflanzenmaterial ist natürlich nur sinnvoll, wenn dieses eine hohe Konversionsrate aufweist. Der Konversionsprozess der künstlichen Samen wird durch mehrere Faktoren beeinflusst, die nachfolgend näher erläutert werden.

2.1.1 Qualität des Pflanzenmaterials

Die Qualität des Pflanzenmaterials hat einen ganz entscheidenden Einfluss auf die Konversion des künstlichen Samens. Wenn mit somatischen Embryonen gearbeitet wird, sollten diese eine normale Entwicklung und phänotypische Uniformität aufweisen (REDENBAUGH *et al.*, 1991). Für andere Explantate wurden bisher kaum Qualitätsmerkmale beschrieben. Bei eingekapselten Nodiensegmenten könnten verschiedene Faktoren wie das Alter der Sprosskulturen, der Typ des Explantats und seine Größe die Konversion und Lagerfähigkeit der künstlichen Samen beeinflussen. Die Nodiensegmente müssen ein hohes

Regenerationspotential besitzen und auch tolerant gegen den Stress sein, der während der Einkapselungs- und Konversionsprozesse auftritt (SANADA *et al.*, 1993).

In den meisten Untersuchungen wurde die Qualität der Nodiensegmente nur über deren Länge definiert. SAJINA *et al.* (1997) und BALLESTER *et al.* (1997) haben Nodiensegmente unterschiedlicher Länge eingekapselt (Tab. 3). Die besten Ergebnisse für Lagerung und Konversion wurde mit 4 bis 6 mm langen Nodiensegmenten erzielt. Kürzere Nodiensegmente waren für die Lagerung nicht so geeignet und die Konversion der künstlichen Samen war geringer. Nodiensegmente von ca. 4-5 mm Länge wurden auch in anderen Arbeiten zur Herstellung der künstlichen Samen mit Erfolg benutzt (BAPAT *et al.*, 1987; BAPAT & RAO, 1990; GANAPATHI *et al.*, 1992; SHARMA *et al.*, 1994; SAJINA *et al.*, 1997), was die Ergebnisse von SAJINA *et al.* (1997) und BALLESTER *et al.* (1997) unterstützt. Die Größe der Explantate war besonders wichtig, wenn das eingekapselte Material für die Kryokonservierung benutzt wurde (JANEIRO *et al.*, 1996).

Tab. (3): Einfluss der Explantatlänge auf die Lagerfähigkeit und Konversion der künstlichen Samen.

Autoren	Jahr	Art	Explantat	Explant- atlänge	Optimum
BALLESTER <i>et al.</i>	1997	<i>Camellia japonica</i> & <i>C. reticulata</i>	Spross- spitze	* 1-2 mm * 5-6 mm * 10-11mm	5-6 mm Länge
SAJINA <i>et al.</i>	1997	- <i>Piper nigrum</i> - <i>Elettaria cardamomum</i> - <i>Zingiber officinale</i> - <i>Curcuma longa</i> - <i>Cinnamomum camphora</i> - <i>Vanilla planifolia</i>	Knospe	2-5 mm	4-5 mm Länge

Es wurde festgestellt, dass der Explantattyp (Sprossspitze bzw. Nodiensegment) die Konversion beeinflusst. Die Konversion der eingekapselten Sprossspitzen war schneller und besser als die der Achselknospen (Lee *et al.*, 1990; PICCIONI & STANDARDI, 1995; BALLESTER *et al.*, 1997; MICHELI *et al.*, 1998; CAPUANO *et al.*, 1998; ARIAS, 1999). Dieses unterschiedliche Verhalten wird mit dem physiologischen Status der Knospen in Verbindung gebracht, ihrem Alter, dem Grad der Dormanz und ihrer Größe (DE KLERK, 1992; VAN TELGEN *et al.*, 1992; FERRADINI *et al.*, 1996; CAPUANO *et al.*, 1998). Die eingekapselten Sprossspitzen konnten länger als Achselknospen gelagert werden (MICHELI

et al. 1998). Die Sprossspitze war als Explantat auch besser geeignet als Achselknospen, wenn die künstlichen Samen unter unsterilen Bedingungen kultiviert wurden, da sie eine schnellere Entwicklung zeigten (Lee *et al.*, 1990).

Es gibt bislang kaum Untersuchungen zum Einfluss der Subkulturdauer (Alter des Pflanzenmaterials) auf die Konversion der künstlichen Samen. Voruntersuchungen bei *Dendranthema x grandiflorum* zeigten, dass die Konversion der Nodiensegmente von 'Snowdon Weiß', 'Topfweiß' und 'Garden mum' bei Verwendung von 5 oder 6 Wochen altem Pflanzenmaterial schneller und besser war als bei 7 oder 8 Wochen altem Pflanzenmaterial (ARIAS, 1999). Auch bei anderen Entwicklungsprozessen, wie der Wurzelbildung, wurde ein Einfluss der Subkulturdauer festgestellt. PINKER (2000) berichtete, dass die Bewurzelung von 5 Wochen alten Sprossen von *Amelanchier lamarckii* besser war als die 7 oder 8 Wochen alter Sprosse, während PINKER *et al.* (1995) bei *Tilia cordata* 'Wega' und PINKER (2000) bei *Prunus kurilensis* 'Brillant' gefunden haben, dass die Wurzelbildung besser wurde, wenn das Alter des Pflanzenmaterials zunahm. Diese wenigen ersten Ergebnisse weisen darauf hin, dass hier noch weitere Untersuchungen erforderlich sind.

2.1.2 Künstliches Endosperm

Das künstliche „Endosperm“ umgibt das Pflanzenmaterial als Schutz vor mechanischen Belastungen (ONISHI *et al.*, 1994), schützt es vor Fäulnis und Trockenheit, wenn die Kugeln auf das Substrat transferiert werden (BAPAT & RAO, 1990) und kann auch der Versorgung mit Nährstoffen, Wachstumsregulatoren und anderen Zusätzen dienen. Es besteht aus einer Gelmatrix, die verschiedene Substanzen enthalten kann.

2.1.2.1 Gelmatrix

Die Gelmatrix, die den Grundkörper des „Endosperms“ bildet, wird aus verschiedenen natürlichen oder synthetischen Polymeren hergestellt, wie z.B. Agar, Gellan, Gelrite, Gelatine, Polyethylenoxid, Zellulose, Chitosan, Na-Alginat, Johannisbrot „locust bean gum“ und Carrageenan (Tab. 4). Zunächst wird das Pflanzenmaterial mit der zähflüssigen Masse des Polymers gemischt und anschließend erfolgt eine Vernetzung (Härtung) des Gels, wobei sich eine Kapsel um das Pflanzematerial bildet. Gelbildner wie Agar und Gellan sind nicht zur

Einkapselung von Pflanzenmaterial geeignet, da sie nur bei Temperaturen über 45°C flüssig sind. Synthetische Polymere wie Polyacrylamid sind ebenfalls ungeeignet, da die Gele durch exotherme Reaktionen oder unter Radikalbildung, die toxisch für das Pflanzenmaterial ist, entstehen. Dagegen haben sich natürliche Polysaccharide wie Na-Alginat oder Carrageenan als besonders vorteilhaft erwiesen, da sie bei Zimmertemperatur flüssig sind und die Vernetzung durch eine ionotrope Reaktion erfolgt.

Tab. (4): Gele für die Einkapselung somatischer Embryonen (REDENBAUGH *et al.*, 1987).

Gel	Konzentration % w/v	Härterlösung	Konzentration mM
Na-Alginat	0,5-5,0	Ca-Salze	30-100
Na-Alginat + Gelatine	2,0 5,0	Ca-Salze	30-100
Carrageenan + Johannisbrot	0,2-0,8 0,4-1,0	K- oder NH ₄ -Salze	500
Gelrite	0,25	niedrige Temperatur	

Am häufigsten wird Na-Alginat für die Einkapselung verwendet (REDENBAUGH *et al.*, 1991), da es inert und nicht toxisch ist, gute Geleigenschaften aufweist, schnell geliert und leicht manipuliert werden kann (ENDRESS, 1994; MARUYAMA *et al.* 1997). Darüber hinaus ist es preiswert und in großen Mengen verfügbar. Dieses saure Polysaccharid wird aus Braunalgen gewonnen und besteht aus 1.4 β -D-Mannuronsäure und α -1-Glucuronsäureresten, die in Menge und Verteilung variieren. Das Natriumsalz des Alginats bildet im Wasser eine zähflüssige Masse. Bei Zugabe von zwei- oder dreiwertigen Kationen (außer Magnesium und Quecksilber) werden Ionenbrücken gebildet und die Gelbildung geht vonstatten. Am häufigsten wird Kalzium zur Gelbildung (Härtung) eingesetzt.

Die Festigkeit der Kapsel wird durch die Gelstärke des Alginats bestimmt, die wiederum von der Konzentration des Na-Alginats und der Härterlösung beeinflusst wird. Die Gelstärke der Kapsel hat einen Effekt auf die Konversion des Pflanzenmaterials und die Handhabbarkeit der künstlichen Samen bei Lagerung und Aussaat. Da es sich bei Na-Alginat um ein Naturprodukt handelt, hängt seine Qualität auch von der Herstellerfirma ab (GHOSH & SEN, 1994; CASTILLO *et al.*, 1998; PATTNAIK & CHAND, 2000).

Es wurde mehrfach gezeigt, dass die Na-Alginatkonzentration die Konversion der künstlichen Samen beeinflusst (BAPAT *et al.*, 1987; BAPAT & RAO, 1988; MATHUR *et al.*, 1989; LEE

et al., 1990; GANAPATHI *et al.*, 1992; GHOSH & SEN, 1994; PATTNAIK *et al.*, 1995; SAJINA *et al.*, 1997; PATTNAIK & CHAND, 2000). Einige vergleichende Untersuchungen zum Einfluss der Na-Alginatkonzentration auf die Konversion der künstlichen Samen sind in Tab. 5 dargestellt. Die optimale Na-Alginatkonzentration wurde meist mit 2,5 und 4% ermittelt (BAPAT *et al.*, 1987; BAPAT & RAO, 1988; LEE *et al.*, 1990; GANAPATHI *et al.*, 1992; GHOSH & SEN, 1994; PATTNAIK *et al.*, 1995; BÜYÜKALACA & MAVITUNA, 1995; PADMAJA *et al.*, 1995; JANEIRO *et al.*, 1997; CASTILLO *et al.*, 1998; PATTNAIK & CHAND, 2000). Nur MATHUR *et al.*, (1989) fanden bei *Valeriana*, dass der Einsatz von 6% Na-Alginat die maximale Konversion brachte. Damit haben sie eine wesentlich höhere optimale Na-Alginatkonzentration als die anderen Autoren verwendet. Es muss demnach berücksichtigt werden, dass für jeden Pflanzentyp die optimale Na-Alginatkonzentration ermittelt werden sollte (SAJINA *et al.*, 1997). Die Na-Alginatkonzentration hatte auch einen Einfluss auf Form und Größe der Kapseln (MATHUR *et al.*, 1989; LEE *et al.*, 1990; PATTNAIK *et al.*, 1995; PADMAJA *et al.*, 1995; BÜYÜKALACA & MAVITUNA, 1995; PATTNAIK & CHAND, 2000). Wenn die Na-Alginatkonzentration zu hoch war, wurden die Kapseln sehr hart und die Konversion war sehr niedrig. Zu niedrige Na-Alginatkonzentrationen waren ungünstig für die Einkapselung, die Kapseln wurden nicht fest und lösten sich schnell auf.

In den meisten Arbeiten wurde nur eine Na-Alginatkonzentration verwendet. Als Beispiele seien genannt: 2% Na-Alginat (PICCIONI & STANDARDI, 1995), 2,5% Na-Alginat (PICCIONI *et al.*, 1996; PICCIONI, 1997; MICHELI *et al.*, 1998), 3% Na-Alginat (RAO & SINGH, 1991; MACHII, 1992; LULSDORF *et al.*, 1993; ONAY *et al.*, 1996; LYNCH *et al.*, 1996; BALLESTER *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2000), 4% Na-Alginat (SHARMA *et al.*, 1994) und 6% Na-Alginat (MUKUNTHAKUMAR & MATHUR, 1992). Am häufigsten wurde über die Verwendung von 3% Na-Alginat berichtet (Tab. 5).

Die Konzentration der **Härterlösung** beeinflusst auch die Festigkeit der Gelkapseln (GHOSH & SEN, 1994; BÜYÜKALACA & MAVITUNA, 1995; PADMAJA *et al.*, 1995; PATTNAIK & CHAND, 2000). Kalziumchlorid ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) wird von 30-100 mM für 10-60 min zur Gelbildung (Härtung) eingesetzt (REDENBAUGH *et al.*, 1993). Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Kalziumchlorid-Konzentrationen zeigten, dass 75 mM optimal sind (Tab. 6). In den meisten Untersuchungen wurde deshalb 75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ für 20-30 min zur Härtung der Gelmatrix verwendet (MATHUR *et al.*, 1989;

BÜYÜKALACA & MAVITUNA, 1995; PATTNAIK *et al.*, 1995; PICCIONI & STANDARDI, 1995; MICHELI *et al.*, 1998; PATTNAIK & CHAND, 2000; SICURANI *et al.*, 2001) (Tab. 6).

Die notwendige Einwirkzeit der Härterlösung hängt von deren Konzentration ab (GHOSH & SEN, 1994; CASTILLO *et al.*, 1998). GHOSH & SEN (1994) zeigten, dass die Einwirkdauer der Härterlösung länger sein muss, wenn niedrige Konzentrationen von Kalziumchlorid verwendet werden. Die Einwirkdauer der Härterlösung kann kürzer sein, wenn höhere Konzentrationen von CaCl_2 verwendet werden.

Tab. (5): Einfluss der Na-Alginatkonzentration auf die Herstellung und Konversion der künstlichen Samen.

Autoren	Jahr	Art	Explantat	Na-Alginat-konz. (%)	Optimum (%)
BAPAT <i>et al.</i>	1987	<i>Morus indica</i>	Knospe	2-4	4
BAPAT & RAO	1988	<i>Santalum album</i>	SE	2-4	3
MATHUR <i>et al.</i>	1989	<i>Valeriana wallichii</i>	Knospe	2-8	6
LEE <i>et al.</i>	1990	<i>Betula davurica</i>	Sprossspitze Knospe	2-5	3-4
GANAPATHI <i>et al.</i>	1992	<i>Musa</i> cv. 'Basrai'	Sprossspitze	2-4	3
GHOSH & SEN	1994	<i>Asparagus cooperi</i>	SE	2-6	3,5
PATTNAIK <i>et al.</i>	1995	<i>Morus indica</i>	Knospe	2-8	4
PADMAJA <i>et al.</i>	1995	<i>Arachis hypogaea</i>	SE	2-4	2,5
BÜYÜKALACA & MAVITUNA	1995	<i>Capsicum annuum</i>	SE	2-6	3
JANEIRO <i>et al.</i>	1997	<i>Camellia japonica</i>	SE	2-4	3
CASTILLO <i>et al.</i>	1998	<i>Carica papaya</i>	SE	1,5 - 2,5	2,5
PATTNAIK & CHAND	2000	<i>Morus spp.</i>	Knospe	2-8	4

Tab. (6): Einfluss der Konzentration der Härterlösung auf die Herstellung der künstlichen Samen.

Autoren	Jahr	Art	Explantat	Härterlösung	Optimum
MATHUR <i>et al.</i>	1989	<i>Valeriana wallichii</i>	Sprossspitze & Knospe	25-125 mM $\text{CaCl}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$	75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$
BÜYÜKALACA & MAVITUNA	1995	<i>Capsicum annuum</i>	SE	25-100 mM $\text{CaCl}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$	75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$
PATTNAIK <i>et al.</i>	1995	<i>Morus indica</i>	Knospe	25-125 mM $\text{CaCl}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$	75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$
PATTNAIK & CHAND	2000	<i>Morus spp.</i>	Knospe	25-100 mM $\text{CaCl}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$	75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$

2.1.2.2 Gelmatrixkomponenten

Dem Alginat können anorganische und organische Substanzen, die **Gelmatrixkomponenten**, zugesetzt werden, die der Ernährung des Pflanzenmaterials und der Steuerung seiner Entwicklung dienen. In den meisten Untersuchungen (MATHUR *et al.*, 1989; LEE *et al.*, 1990; MUKUNTHAKUMAR & MATHUR, 1992; SHARMA *et al.*, 1994; PATTANAIK *et al.*, 1995; PICCIONI & STANDARDI, 1995; BALLESTER *et al.*, 1997) wurden Nährstoffe (Salze und Zucker) sowie Wachstumsregulatoren der Gelmatrix für die Verbesserung der Konversion der künstlichen Samen zugegeben und sehr oft waren diese Stoffe auch im Konversionssubstrat enthalten.

2.1.2.2.1 Nährstoffe

Am wichtigsten ist wahrscheinlich die Bereitstellung von energiereichen Stoffen für die Entwicklung des Explantats, dazu könnten verschiedene Reservestoffe wie Kohlehydrate, Eiweiße oder Fette über die Kapsel oder das Konversionssubstrat angeboten werden. In den ersten Arbeiten wurde der Zusatz von Speicherstoffen wie z.B. Stärke geprüft, wodurch jedoch die Entwicklung der eingekapselten Explantate nicht gefördert wurde. Die Zugabe von Maltose hingegen verbesserte die Konversion bei künstlichen Samen von *Medicago sativa* L. (REDENBAUGH *et al.*, 1991). In diesen Untersuchungen wurde auch gezeigt, dass die Kapsel unbedingt Zucker (Maltose) und Makronährstoffe enthalten muss, wenn die Konversion auf einem inerten, nährstoffarmen Substrat wie Perlit oder Torf erfolgen soll. Der Zusatz von Mikronährstoffen und weiteren organischen Stoffen war nicht unbedingt erforderlich. Inzwischen verwenden die meisten Autoren Saccharose, die der Kapsel direkt zugesetzt wird oder über das Konversionssubstrat zur Verfügung steht. SAKAMOTO *et al.* (1995) brachte sogar granuliert Saccharose in die Kapseln ein, um eine langsame Freisetzung der Zucker in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur zu ermöglichen. Die Saccharosekonzentration der Gelmatrix betrug meist 3% (MATHUR *et al.*, 1989; BAPAT & RAO, 1990; MUKUNTHAKUMAR & MATHUR, 1992; GANAPATI *et al.*, 1992; SHARMA *et al.*, 1994; PATTNAIK *et al.*, 1995).

Die in Tab. 7a zusammengestellten Arbeiten vergleichen den Einfluss der Nährsalze mit dem des Zuckers auf die Konversion eingekapselter Knospen verschiedener krautiger und holziger Pflanzen. Es wird deutlich, dass die Versorgung der Explantate mit Nährsalzen nicht

ausreicht, sondern immer auch Saccharose in der Kapsel vorhanden sein muss. Leider gibt es keine Varianten, in denen nur Saccharose ohne Nährsalze appliziert wurden. BALLESTER *et al.* (1997) verglichen den Einfluss verschiedener Saccharosekonzentrationen (1,5-5%) auf die Konversion von *Camellia*-Knospen und hatten die höchsten Konversion bei 5% Saccharose. KINOSHITA & SAITO (1990) steigerten die Saccharosekonzentration in der Kapsel sogar von 0,5 bis auf 39% und fanden, dass die eingekapselten Nodiensegmente von *Betula platyphylla* sich auf einem nährstofffreien Agar-Wasser-Medium nur entwickeln konnten, wenn die Kapseln mindestens 5% Saccharose enthielten und die Konversion bei 22-39% Saccharose besser und schneller war. Die Zugabe von Saccharose über 3,4% zur Kapsel hatte einen toxischen Effekt und verschob die Entwicklung der eingekapselten Knospen von *Dioscorea alata*, *D. opposita* und *D. rotundata*, wenn die künstlichen Samen auf einem MS-Medium mit 3% Saccharose kultiviert wurden. Es gab auch Unterschiede in der Konversion zwischen *Dioscorea*-Arten in Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration (HASAN & TAKAGI, 1995). Das Fehlen von Saccharose in der Gelmatrix hemmte die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente von *Morus indica* (BAPAT & RAO, 1990) sowie *Betula davurica* (LEE *et al.*, 1990).

Der Einfluss von Nährsalzen auf die Konversion darf jedoch nicht unterschätzt werden. RAO & SINGH (1991) haben den Einfluss der MS-Salze im Konversionssubstrat auf die Konversion von eingekapselten somatischen Embryonen von *Solanum melongena* L. untersucht. Die Konversion war besser bei Einsatz der vollen Konzentration der MS-Salze als bei der Reduktion des Salzgehaltes auf die Hälfte.

Diese Untersuchungen belegen, dass eine ausreichende Versorgung des Explantates mit Nährstoffen über den gesamten Entwicklungszeitraum erforderlich ist. Wenn diese Nährstoffe allein über die Kapsel angeboten werden sollen, könnten Probleme auftreten. In den meisten Arbeiten wurde nur eine Vollkugel-Alginat-Kapsel verwendet, die den Nährstoffverlust ins nährstofffreie Konversionssubstrat nicht verhindern kann. Leider gibt es keine Literaturangaben, wie schnell die Nährstoffabgabe ins Konversionssubstrat erfolgt. Das wäre jedoch wichtig zu wissen, wenn die Versorgung des Explantates ausschließlich durch die Gelmatrixkomponenten erfolgen soll.

Tab. 7a: Einfluss der Gelmatrixkomponenten (Nährsalze und Zucker) auf die Konversion der künstlichen Samen.

Autoren	Jahr	Art	Explantat	Nährsalze und Zucker	Optimum
MATHUR <i>et al.</i>	1989	<i>Valeriana wallichii</i>	Knospe	- MS Salze - MS + 3% Sacc.	MS + 3% Sacc.
BAPAT & RAO	1990	<i>Morus indica</i>	Knospe	- MS Salze - MS + 3% Sacc.	MS + 3% Sacc.
KINOSHITA & SAITO	1990	<i>Betula platyphylla</i>	Knospe	- MS + 0,5 bis 39% Sacc.	MS + 22 bis 39% Sacc.
LEE <i>et al.</i>	1990	<i>Betula davurica</i>	Knospe	- WPM - WPM + 3% Sacc.	WPM + 3% Sacc.
PATTNAIK <i>et al.</i>	1995	<i>Morus indica</i>	Knospe	- Wasser - MS Salze - MS + 3% Sacc.	MS + 3% Sacc.
HASAN & TAKAGI	1995	<i>Dioscorea alata</i> , <i>D. opposita</i> & <i>D. rotundata</i>	Knospe	- Ca-freies MS + 0,0 bis 34,2% Sacc.	Ca-freies MS + 0,0 bis 3,4% Sacc.
BALLESTER <i>et al.</i>	1997	<i>Camellia japonica</i> & <i>C. reticulata</i>	Knospe	- Wasser - MS Salze - MS + 1,5 bis 5% Sacc.	MS + 3 bis 5% Sacc.

2.1.2.2.2 Wachstumsregulatoren

Zur Regulation der Spross- und Wurzelentwicklung müssen in vielen Fällen auch bei den eingekapselten Nodiensegmenten Wachstumsregulatoren angewendet werden. Bei der Herstellung der künstlichen Samen werden oft Auxine zur Gelmatrix zugesetzt, wobei sie hier entweder zur Bewurzelung oder aber in Verbindung mit anderen Phytohormonen, meist Cytokininen, zur Regulation der Spross- und Wurzelbildung und Verbesserung der Konversion dienen. Die Cytokinine werden zur Steuerung der Regeneration von Adventivsprossen meist in Kombination mit Auxinen benutzt oder auch allein zur Auslösung der Verzweigung von Achselknospen (HORN & LANGE, in HORN, 1996).

In den meisten Untersuchungen (MATHUR *et al.*, 1989; LEE *et al.*, 1990; MUKUNTHAKUMAR & MATHUR, 1992; SHARMA *et al.*, 1994; PATTNAIK *et al.*, 1995; PICCIONI & STANDARDI, 1995; BALLESTER *et al.*, 1997) wurden die Wachstumsregulatoren gemeinsam mit Nährsalzen und Saccharose den Kapseln zugesetzt. MATHUR *et al.* (1989), Lee *et al.* (1990) und BALLESTER *et al.* (1997) haben gefunden,

dass der Zusatz von Auxin und Cytokinin zur Kapsel die Konversion der eingekapselten Knospen verbesserte im Vergleich zu der Variante, die kein Auxin und Cytokinin enthielt (Tab. 7b). PATTNAIK *et al.* (1995) haben dagegen bei *Morus* nur Cytokinin (1,0 mg/l BAP) verwendet und auch damit eine verbesserte Konversion im Vergleich mit der wachstumsregulatorfreien Variante erzielt (Tab. 7b). Eine komplexe Gelmatrix mit Cytokinin (MS Salze + Sacc. + 3 mg/l Kinetin) wurde auch bei künstlichen Samen von *Zingiber officinale* verwendet (SHARMA *et al.*, 1994).

Tab. 7b: Einfluss der Wachstumsregulatoren auf die Konversion der künstlichen Samen.

Autoren	Jahr	Art	Explantat	Gelmatrix	Optimum
MATHUR <i>et al.</i>	1989	<i>Valeriana wallichii</i>	Knospe	- MS Salze. - MS + 3% Sacc. + myo-Inositol. - MS + 3% Sacc. + 100 mg/l myo-Inositol + 5 mg/l Kinetin + 1,0 mg/l IES.	MS + 3% Sacc. + 100 mg/l myo-Inositol + 5 mg/l Kinetin + 1,0 mg/l IES.
LEE <i>et al.</i>	1990	<i>Betula davurica</i>	Knospe	- WPM - WPM + 0,5 mg/l IBS - WPM + 0,5 mg/l IBS + 0,5 mg/l BAP + 3% Sacc.	WPM + 0,5 mg/l IBS + 0,5 mg/l BAP + 3% Sacc.
PATTNAIK <i>et al.</i>	1995	<i>Morus indica</i>	Knospe	- Wasser. - MS Salze. - MS + 3% Sacc. + 100 mg/l myo-Inositol. - MS + 3% Sacc. + 100 mg/l myo-Inositol + 1 mg/l BAP.	MS + 3% Sacc. + myo-Inositol + 1 mg/l BAP.
BALLES- TER <i>et al.</i>	1997	<i>Camellia japonica</i> & <i>C. reticulata</i>	Knospe	- Wasser. - MS Salze. - MS + Vit. + 3% Sacc. - MS + Vit. + 3% Sacc. + 4,4 mM BAP + 0,57 mM IES.	MS + Vit. + 3 % Sacc. + 4,4 mM BAP + 0,57 mM IES.

2.1.3 Samenschale

Am wenigsten bearbeitet ist bisher die Entwicklung einer Samenschale, die Schutz vor Mikroben und Austrocknung bietet, die Konversion des Pflanzenmaterials jedoch nicht behindert.

Es wird vorgeschlagen, die klebrige Alginatkapsel mit hydrophoben Material wie z.B. EWAX (Ethylenvinylacetatacrylterpolymer) zu umgeben, um damit den Schutz der Kapsel vor Austrocknung und die mechanische Belastbarkeit durch die Aussaatmaschinen zu verbessern (REDENBAUGH *et al.*, 1991).

Die Konversion kann erleichtert werden, wenn sogenannte sich selbst öffnende („self-breaking“) Kapseln verwendet werden. Bei diesen erfolgt zur Erleichterung des Öffnens der Kapseln eine weitere Behandlung mit Na NO₃ (SAKAMOTO *et al.*, 1995).

KINOSHITA & SAITO (1992) verwendeten Zwei-Schicht-Alginat-Kugeln zur Einkapselung der Nodiensegmente von *Betula platyphylla*. Die innere Schicht enthielt die Saccharose und die Nodiensegmente wurden in die äußere Schicht gelegt. Die meisten der eingekapselten Nodiensegmente wuchsen auf unsterilisiertem Perlite bei Verwendung dieser Zwei-Schicht-Kapsel.

2.2 Methoden der Einkapselung

Die Versorgung mit Nährstoffen ist Voraussetzung für die Entwicklung der eingekapselten Explantate (s 2.1.2.2.1). Zunächst ist es unerheblich, ob diese Nährstoffe über die Kapsel oder das Konversionssubstrat angeboten werden. Die Nährstoffversorgung ausschließlich über die Kapsel wird wichtig, wenn die Konversion auf einem inerten, nährstoffarmen Substrat wie Perlite oder Torf erfolgen soll (REDENBAUGH *et al.*, 1991). Trotz der Zugabe der Nährstoffe zur Kapsel war die Konversionsrate in vielen Untersuchungen zu niedrig, wenn die künstlichen Samen auf einem Agar-Wasser-Medium kultiviert wurden (KINOSHITA & SAITO, 1990; MACHII, 1992; SHARMA *et al.*, 1994; PICCIONI & STANDARDI, 1995), (Tab. 8). Es scheint so, als ob die Kapseln nicht genug Nährstoffe enthielten, um die Entwicklung der Nodiensegmente zu ermöglichen. Das kann auch durch die Methode der Herstellung bedingt sein. In Tab. 8 sind Arbeiten zusammengefasst, bei denen zur Herstellung

der Kapseln unterschiedliche Methoden angewendet wurden. Bisher wurden diese Methoden nicht direkt miteinander verglichen. Die Zugabe der Nährstoffe erfolgte entweder nur zum Na-Alginat (KINOSHITA & SAITO, 1990, MACHII, 1992, PICCIONI & STANDARDI, 1995) oder auch in der Härterlösung (MATHUR *et al.*, 1989, MUKUNTHAKUMAR & MATHUR, 1992) bzw. in der Waschlösung (SHARMA *et al.*, 1994). In vielen Untersuchungen wurde die Härterlösung nur mit Wasser angesetzt und zur anschließenden Wäsche Wasser verwendet (GANAPATHI *et al.*, 1992; PICCIONI & STANDARDI, 1995; SAJINA *et al.*, 1997), so dass man davon ausgehen kann, dass diese Herangehensweise üblich ist. Viele Autoren empfahlen eine Wäsche der Kugeln nach der Härterlösungsbehandlung, um das CaCl_2 auszuwaschen (BAPAT *et al.*, 1987; BAPAT & RAO, 1990; GHOSH & SEN, 1994; SHARMA *et al.*, 1994; CASTILLO *et al.*, 1998). Das kann natürlich zur Folge haben, dass die Nährstoffe, die dem Na-Alginat beigemischt wurden, schon bei der Härtung und der Wäsche wieder ausgewaschen werden, die Kapsel also kaum noch Nährstoffe enthält.

Aus Untersuchungen von MATHUR *et al.* (1989) und MUKUNTHAKUMAR & MATHUR (1992) ist bekannt, dass der Zusatz von MS-Medium zur Gelmatrix und zur Härterlösung gute Konversionsergebnisse brachte, wenn die eingekapselten Explantate auf einem nährstoffarmen Substrat kultiviert wurden (Tab. 8).

In den Untersuchungen von KINOSHITA & SAITO (1990) wurde gezeigt, dass sich *Betula*-Nodiensegmente auf dem Agar-Wasser-Substrat zu 100% entwickeln konnten, wenn die Kapseln eine überhöhte Saccharosekonzentration von mindestens 5% erhielten. Dann waren auch nach der Behandlung mit der wässrigen Härterlösung und der Wäsche noch genügend Nährstoffe für die Entwicklung vorhanden. Andererseits genügte bei *Zingiber* auch die erneute Zugabe von MS-Salzen in der Wäsche nicht, um die Entwicklung auf dem Agar-Wasser-Substrat zu ermöglichen. Hier fehlte vielleicht die Zugabe von Saccharose. Es ist wahrscheinlich, dass die Ansprüche bei der Nährstoffversorgung kulturabhängig sind. Darauf weisen auch die Untersuchungen von PICCIONI & STANDARDI (1995) hin. Die Nährstoffe wurden nur der Na-Alginatlösung zugesetzt. Die Konversion der fünf untersuchten Gehölzkulturen auf dem Agar-Wasser-Substrat reichte von 0 bis 48% (Tab. 8).

Tab.(8): Einfluss der Methoden der Einkapselung auf die Konversion der künstlichen Samen.

Autoren	Jahr	Art	Methoden der Einkapselung			Konversions-substrat	Kon-version %
			Gelmatrix (Na-Alginat)	Härtung (CaCl ₂)	Wäsche		
MATHUR <i>et al.</i>	1989	<i>Valeriana wallichii</i>	MS + 30 g/l Sacc. + myo-Inositol + 5 mg/l Kin. + 1,0 mg/l IES.	gleiche Gel-matrix-komp.	ohne Wäsche	Agar + W.	96-100
						Vermiculit + W.	90-94
						Sand + W.	90
						Erde + W.	80-86
KINOSH-ITA & SAITO	1990	<i>Betula platyphylla</i>	Nährmedium + 0,05 mg/l IBS + 0,5 mg/l GA ₃ + 0,01 mg/l IES + 0,8 mg/l Kin. + 0,5% Sacc.	mit Wasser	„ „	Agar + W.	0,0
						gleiche Gelmatrixkomp.	100
						Agar + MS-Salze	0,0
						Agar + Horm.	0,0
						Agar + 0,5 % Sacc.	100
			gleiche Komp. + 5% Sacc.	„ „	„ „	Agar + W.	100
MUKUN-THAKU-MAR & MATHUR	1992	<i>Dendroca-lamus strictus</i>	MS + Sacc. + Horm.	gleiche Gel-matrix-komp.	„ „	Agar + W.	96
MACHII	1992	<i>Morus alba</i>	MS + Horm. + Fruktose	mit Wasser	„ „	Agar + W.	25
						MS	100
			Alginat + W.	„ „	„ „	Agar + W.	0,0
						MS	100
SHARMA <i>et al.</i>	1994	<i>Zingiber officinale</i>	MS-Med.	„ „	MS-Salze	Agar + W.	16,7
						MS-Med.	81,8
PICCIONI & STANDAR- DI	1995	<i>Actinidia deliciosa</i> cv. 'Tomuri'	Lepoivre-Med. + Horm. + Sacc.	„ „	mit Wasser	Agar + W.	48
			Alginat + W.	„ „	„ „	Lepoivre-Med.	95
		<i>Betula pendula</i>	MS-Med.	„ „	„ „	Agar + W.	0,0
			Alginat + W.	„ „	„ „	MS	100
		<i>Crataegus oxyacanta</i>	MS-Med.	„ „	„ „	Agar + W.	0,0
			Alginat + W.	„ „	„ „	MS	100
		<i>Malus spp.</i> cv. 'M.27'	Lepoivre-Med. + Horm. + Sacc.	„ „	„ „	Agar + W.	30
			Alginat + W.	„ „	„ „	Lepoivre-Med.	100
		<i>Rubus spp.</i> cv. 'Black Satin'	MS + Horm. + Sacc.	„ „	„ „	Agar + W.	11
			Alginat + W.	„ „	„ „	MS-Med.	91

In den meisten Fällen haben die Autoren mit einem komplexen Konversionssubstrat (MATHUR *et al.*, 1989) gearbeitet, das alle Nährstoffe enthielt, so dass der Einfluss von Wäsche und Zusammensetzung der Härterlösung nicht deutlich werden konnte. Nur in wenigen Arbeiten (KINOSHITA & SAITO, 1990; MACHII, 1992; SHARMA, 1994; PICCIONI & STANDARDI, 1995), in denen eine wässrige Härterlösung und Wäsche mit Wasser angewendet wurde bzw. die Wäsche mit Nährlösung erfolgte oder nicht gewaschen wurde, wurde ein nährstofffreier Agar als Konversionssubstrat verwendet. Die Konversion erreichte artabhängig maximal 48% und lag damit weit unter der Konversion auf einem nährstoffhaltigem Agar (Tab. 8). In den Arbeiten, in denen der Härter- und Waschlösung Nährstoffe zugesetzt wurden, wurde leider auch ein nährstoffhaltiger Agar verwendet (BÜYÜKALACA & MAVITUNA, 1995; PICCIONI *et al.*, 1996; PICCIONI, 1997; CAPUANO *et al.*, 1998; MICHELI *et al.*, 1998).

Aussagen über den Einfluss der Zusammensetzung von Härter- und Waschlösung auf die Konversion und Nährstoffversorgung der Explantate können deshalb aus der Literatur nur bedingt gewonnen werden und müssen erst erarbeitet werden.

2.3 Methoden der Sterilisation

Die Sterilisationsmethode spielt eine Rolle in der Herstellung der künstlichen Samen. SAKAMOTO *et al.* (1992) berichteten, dass die Sterilisation mit UV-Strahlen (2,0 μ W cm für 10 min) besser war als Autoklavieren bei 1 Atm., 121°C für 15 min, weil das Autoklavieren eine niedrigere Viskosität und auch eine niedrigere Gelstärke verursachte.

2.4 Konversionssubstrate

Die künstlichen Samen können auf verschiedenen Substraten ausgelegt werden. Meist wurden Agarsubstrat mit oder ohne Nährstoffe für die Konversion der künstlichen Samen unter In-vitro-Bedingungen verwendet (KINOSHITA & SAITO, 1990; MACHII, 1992; SHARMA *et al.*, 1994; PICCIONI & STANDARDI, 1995).

Die künstlichen Samen wurden auch auf anderen Substraten wie Sand, Erde, Vermiculit (BAPAT *et al.*, 1987; MATHUR *et al.*, 1989), Filterpapier (BAPAT *et al.*, 1987; BAPAT &

RAO, 1990), Baumwolle (BAPAT & RAO, 1990), Perlit (KINOSHITA & SAITO, 1992), und Soilrite-Mischung (PATTNAIK *et al.*, 1995) ausgelegt.

Für die Konversion der künstlichen Samen unter unsterilen Bedingungen muss nach einem geeigneten Substrat gesucht werden. Die Auswahl des Substrates erfolgt unter Berücksichtigung der chemischen und physikalischen Eigenschaften wie Wasser- und Luftkapazität, Nährstoffgehalt und pH-Wert, die Konversionsrate und -geschwindigkeit beeinflussen können, und der Verfügbarkeit sowie des Preises. Das Konversionssubstrat wird als geeignet betrachtet, wenn die Konversion der künstlichen Samen schnell und gut war.

2.5 Konversion der künstlichen Samen unter unsterilen Bedingungen

Bei der Aussaat der künstlichen Samen unter unsterilen Bedingungen zeigten sich einige Probleme. Das Hauptproblem stellten Infektionen mit Mikroorganismen dar, die sich auf den künstlichen Samen vermehrten, insbesondere wenn die künstlichen Samen Zucker enthielten. Die Verbesserung der Konversion künstlicher Samen unter unsterilen Bedingungen wurden durch den Zusatz von Antibiotika und/oder Fungiziden zur Gelmatrix erlangt (MATHUR *et al.*, 1989; BAPAT & RAO, 1990; GANAPATHI *et al.*, 1992; PATTNAIK *et al.*, 1995), (Tab. 9). SHARMA *et al.* (1994) berichteten über die Möglichkeit der Keimung der künstlichen Samen unter unsterilen Bedingungen durch den Zusatz von Fungiziden zur Gelmatrix. Der Zusatz von Antibiotika und/oder Fungiziden zur Gelmatrix beeinträchtigt jedoch die Vitalität des Pflanzenmaterials. Deshalb ist die Verwendung dieser Mittel nicht erwünscht und es muss nach Alternativen gesucht werden.

KINOSHITA & SAITO (1992) verwendeten Zwei-Schicht-Alginat-Kugeln zur Einkapselung von Nodiensegmenten von *Betula platyphylla*. Die innere Schicht enthielt Saccharose und die Nodiensegmente wurden in die äußere Schicht gelegt. Die meisten der eingekapselten Nodiensegmente wuchsen auf unsterilisiertem Perlit, wenn diese Zwei-Schicht-Kapseln verwendet wurden. Für künstliche Samen von *Dendrocalamus strictus* wurde Mineralöl als Außenschicht benutzt, das einen zusätzlichen Schutz gegen Trockenheit darstellt, billig ist und das Durchsickern der Nährstoffe und das Eindringen von Mikroorganismen verhindert. Damit konnte die Konversion auf 56% erhöht werden (MUKUNTHAKUMAR & MATHUR, 1992). Der Zusatz von Aktivkohle zur Gelmatrix verbesserte die Keimung (auf ca. 40-60%) und die Wurzelentwicklung von eingekapselten somatischen Embryonen von *Picea glauca*

engelmannii und *Picea mariana* (LULSDORF *et al.*, 1993) und verhinderte Nährstoffverluste (LULSDORF *et al.*, 1993; REDENBAUGH *et al.*, 1993).

Tab. (9): Der Zusatz von Antibiotika und/oder Fungiziden zur Gelmatrix für die Verbesserung der Konversion der künstlichen Samen unter unsterilen Bedingungen.

Autoren	Jahr	Art	Antibiotika	Fungizide	Optimum
MATH-UR <i>et al.</i>	1989	<i>Valeriana wallichii</i>	keine	keine	Rose Bengal + Bavistin (64% Konversion auf Vermiculit).
			Rose Bengal	Bavistin	
BAPAT & RAO	1990	<i>Morus indica</i>	keine	50 oder 100 mg/l Carbendenzim	50 oder 100 mg/l Carbendenzim (63% Konversion auf Erde).
				50 oder 100 mg/l Benomyl	
				50 oder 100 mg/l Bavistin	
GANA-PATHI <i>et al.</i>	1992	<i>Musa cv. 'Basrai'</i>	keine	keine	60 mg/l Rifampicin + 250 mg/l Cefatoxime + 25 mg/l Tetracycline HCL + Aktivkohle (10% Konversion auf Erde).
			60 mg/l Rifampicin + 250 mg/l Cefatoxime + 25 mg/l Tetracycline HCL + Aktivkohle.	keine	
PATtn-AIK <i>et al.</i>	1995	<i>Morus indica</i>	keine	keine	250 mg/l Rose Bengal + 10 mg/l Bavistin (45-65% Konversion).
			250 mg/l Rose Bengal	keine	
			keine	10-20 mg/l Bavistin	
			250 mg/l Rose Bengal	10 mg/l Bavistin	

2.6 Einkapselung von Nodiensegmenten aus dem Gewächshaus

Bis jetzt hat es nur einen bekannten Versuch zur Einkapselung von Freilandnodiensegmenten gegeben (PATtnAIK *et al.*, 1995 mit *Morus indica*). Es wäre interessant, diesen Ansatz aufzunehmen und auszubauen, indem auch Nodiensegmente aus dem Gewächshaus für die Einkapselung verwendet werden.

Verglichen mit der Einkapselung von In-vitro-Sprossknospen, kann die Einkapselung von Knospen aus dem Freiland oder dem Gewächshaus einige Vorteile bieten. Die Phase der In-vitro-Kultur wird vermieden und damit auch die Probleme, die mit der In-vitro-Kultur zusammenhängen wie erhöhte somaklonale Variabilität und epigenetische Veränderungen durch Langzeiteffekte von Wachstumsregulatoren.

2.7 Lagerung der künstlichen Samen

Die Erhaltung der genetischen Ressourcen ist notwendig für die Zukunft ertragreicher Systeme und für die Verhinderung der genetischen Erosion. Es gibt verschiedene In-situ, Ex-situ- und In-vitro-Verfahren, die zur Erhaltung der genetischen Vielfalt angewendet werden. Die Bewahrung der Pflanzen im Anbau (in situ) oder in Feld-Genbanken (ex situ) erfordert riesige Landflächen und ist sehr teuer. Die Pflanzen werden durch Schädlinge, Krankheiten und andere natürliche Gefahren bedroht (ENGELMANN, 1997; WITHERS & ENGELMANN, 1998; MARTÍNEZ *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2000). Die gebräuchlichste Ex-situ-Methode ist die Lagerung von Samen, die jedoch nicht für alle Arten verwendet werden kann. Alternativ können In-vitro-Methoden eingesetzt werden. Auch bei der In-vitro-Lagerung muss mit hohen Kosten gerechnet werden, die beim Erhalten von Stamm-Kulturen entstehen. Dazu kommt das Risiko, Kulturen durch Kontamination zu verlieren und es muss mit der Akkumulation von somaklonalen Variationen mit der Zeit gerechnet werden (SCOWCROFT, 1984; WANG *et al.*, 2000). Die konventionelle In-vitro-Lagerung erfordert ca. 4-6 Subkulturen auf frisches Medium im Jahr, um das Verbräunen zu verhindern und Verlust zu vermeiden. Mit der Lagerungsmethode durch den Einsatz der Alginat-Einkapselungstechnik könnten die Kosten für die Behandlung und das Verlustrisiko durch Kontamination um das 4-6fache reduziert werden (MARUYAMA *et al.* 1997). Die Ca-Alginat-Kugel hemmt das Wachstum. Das wird auf eine Drosselung des Atmungsprozesses in den eingekapselten Zellen zurückgeführt (BRODELIUS *et al.* 1982).

Die Erhaltung der genetischen Ressourcen durch Einkapselung von Pflanzenmaterial ist einer der möglichen Vorteile der künstlichen Samen und ist daher sehr wichtig. Es gibt zwei Methoden zur Lagerung der künstlichen Samen:

1. Lagerung der künstlichen Samen (k. S.) bei niedrigen Temperaturen (über 0°C).
2. Kryokonservierung.

2.7.1 Lagerung bei niedrigen Temperaturen (über 0°C)

Die konventionelle In-vitro-Lagerung nutzt Bedingungen, die nur minimale Wachstumsraten erlauben. Für einige Arten wurden Untersuchungen zur In-vitro-Lagerung durch den Einsatz der Alginat-Einkapselungstechnik beschrieben (BAPAT & RAO, 1988; GHOSH & SEN, 1994; MARUYAMA *et al.*, 1997; PATTNAIK & CHAND, 2000).

In den meisten Untersuchungen wurden die künstlichen Samen, die Nodiensegmente oder somatische Embryonen enthielten, bei 4°C gelagert (BAPAT *et al.*, 1987; KINOSHITA & SAITO, 1990; MATHUR *et al.*, 1991; KINOSHITA & SAITO, 1992; LULSDORF *et al.*, 1993; SHIGETA *et al.*, 1993). Bei tropischen Pflanzen wurden von einigen Autoren auch höhere Temperaturen mit Erfolg eingesetzt (MARUYAMA *et al.*, 1997; SAJINA *et al.*, 1997), (Tab. 10). Die Lagerungsdauer war sehr unterschiedlich und Zeiträume von 4 bis 12 Monaten wurden beschrieben. Oft nahm die Vitalität des Pflanzenmaterials schon nach 4 Wochen ab (BAPAT *et al.*, 1987; KINOSHITA & SAITO, 1990; LULSDORF *et al.*, 1993), aber auch eine Lagerzeit von 12 Monaten (MARUYAMA *et al.*, 1997) ist unter praktischen Gesichtspunkten noch zu kurz. Die geringe Lagerungszeit kann vielleicht darauf zurückgeführt werden, dass die Einkapselung die Verfügbarkeit von Sauerstoff reduziert (LULSDORF *et al.*, 1993; BALLESTER *et al.*, 1997).

Tab. (10): Lagerung der künstlichen Samen bei niedrigen Temperaturen über 0°C.

Autoren	Arten	Explantat	Temperatur	Lagerungs-medium	Optimum
BAPAT <i>et al.</i> (1987)	<i>Morus indica</i>	Knospe	*4°C *R. Temp.	* MS-Medium	4°C (für 45 Tage).
SHIGETA <i>et al.</i> (1993)	<i>Daucus carota</i>	SE	*4°C *R. Temp.	* Wasser * MS-Lösung	4°C in einer MS-Lösung.
MARUYAMA <i>et al.</i> (1997)	- <i>Cedrela odorata</i> - <i>Guazuma crinita</i> - <i>Jacaranda mimosaeifolia</i>	Sprossspitze	12, 20 und 25°C	* Agar + Wasser * Agar + W.+ Sacc. * Sacc. & Horm. freies Medium (WPM) +Agar	12°C für 12 Monate mit <i>C. odorata</i> , 25°C für 12 Monate mit <i>G. crinita</i> , und 20°C für 6 Monate mit <i>J. mimosaeifolia</i> auf einem Agar-Wasser-Medium.
SAJINA <i>et al.</i> (1997)	- <i>Piper nigrum</i> - <i>Elettaria cardamomum</i> - <i>Zingiber officinale</i> - <i>Curcuma longa</i> - <i>Cinnamomum camphora</i> - <i>Vanilla planifolia</i>	SE und Knospe	5, 15 & 22 ± 2°C	* Wasser * MS-Lösung	22 ± 2°C im Wasser und/oder in einer MS-Lösung für 4-10 Monate.

Die Lagerung der künstlichen Samen bei niedrigen Temperaturen erfolgte auf festen- oder in flüssigen Medien, z.B. auf Agar + Wasser, Agar + Nährmedium, MS-Lösung, Mineralöl. MARUYAMA *et al.* (1997) verglichen verschiedene Lagerungsmedien (Tab. 10) und fanden die beste Konversion nach 12 Monaten auf einen Wasser-Agar-Medium. Eingekapselte, somatischen Embryonen von *Daucus carota* hatten eine bessere Lagerfähigkeit im flüssigen MS-Medium als im Wasser (SHIGETA *et al.*, 1993), (Tab. 10). MATHUR *et al.* (1991) konnten die eingekapselten Knospen von *Morus* bei 4°C im Mineralöl für 6 Monate lagern. SHIGETA *et al.* (1993) gaben dem Lagerungsmedium Mannitol zu, einen metabolisch inaktiven Zucker-Alkohol. Mannitol im Medium verminderte die Verfügbarkeit von Wasser durch die Erhöhung des osmotischen Druckes und sollte deshalb das Wachstum der Explantate hemmen.

2.7.2 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung ist eine ideale Methode zur Langzeitlagerung, da alle metabolischen Prozesse des gelagerten Pflanzenmaterials bei diesen tiefen Temperaturen (-196°C) gestoppt werden (ENGELMANN, 1997; WITHERS & ENGELMANN, 1998; WANG *et al.*, 2000). Theoretisch kann das Pflanzenmaterial so ohne Veränderungen für eine sehr lange Zeit gelagert werden (SCOTTEZ *et al.*, 1992; ENGELMANN, 1997; GONZALEZ-ARNAO *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2000). SCOTTEZ (1993) und TANNOURY (1993) zeigten, dass Sprossspitzen von *Pyrus communis* L. und *Dianthus caryophyllus* L. nach 2-3 Jahren Lagerung bei -196°C vital und nicht verändert war. Ein weiterer Vorteil der Kryokonservierung ist die Verringerung des benötigten Lagerraumes, da sehr kleine Explantate (somatische Embryonen, Meristeme) eingefroren werden (WANG *et al.*, 2000).

Die meisten pflanzlichen Zellen enthalten einen hohen Anteil Wassers und sind somit sehr anfällig für Gefrierverletzungen. Daher werden die Zellen künstlich dehydriert, bevor sie in flüssigen Stickstoff gelegt werden, so dass intrazellulär kein Eis mit gefährlichen Kristallen entstehen kann. Die angewendeten Techniken zur Vermeidung von Gefrierschäden im Gewebe unterscheiden sich in der klassischen und modernen Gefriertechnik. Während im klassischen Verfahren frostinduzierte Dehydrierung angewendet wird, basieren die neuen Methoden auf Vitrifikation (ENGELMANN, 1997).

Bei Anwendung der **klassischen Technik** wird das Explantat auf eine definierte Vorfrostd-Temperatur langsam heruntergekühlt, dann folgt das schnelle Einfrieren in flüssigem Stickstoff (-196°C). Bei Zellsuspensionen wurden oft zusätzlich Gefrierschutzmittel eingesetzt. Die klassische Gefriertechnik ist eine sehr erfolgreiche Methode zur Lagerung von Zellsuspensionen, Kallus und anderen Kultursystemen, welche aus kleinen, relativ uniformen Geweben bestehen (ENGELMANN, 1997). Dieses Verfahren ist jedoch weniger geeignet für die Gefrierkonservierung von großen Explantaten, die eine Mischung von verschiedenen Zellgrößen und -typen umfassen (DEREUDDRE *et al.*, 1988 mit *Dianthus caryophyllus*; ENGELMANN, 1997). Die meisten klassischen Verfahren erfordern ein teures Gerät für das programmierbare Absenken der Temperatur. Die Überlebensrate der Explantaten ist oft niedrig (ENGELMANN, 1997).

In den letzten Jahren sind mehrere **neue Techniken** für Kryokonservierung der Sprossspitzen von Pflanzen aus den Tropen und den gemäßigten Klimaten entwickelt worden (ENGELMANN, 1997; WITHERS & ENGELMANN, 1998; WANG *et al.*, 2000). Diese neuen Techniken basieren auf Vitrifikationsverfahren. Hierbei wird intrazelluläres Wasser früher entfernt als beim klassischen Verfahren. Der Dehydrierung folgt meist ein schnelles Abkühlen. Als Resultat „verglasen“ die internen gelösten Stoffe, so dass die schädliche Eisbildung im Inneren vermieden wird. Die neuen Kryokonservierungstechniken bieten praktische Vorteile im Vergleich zur klassischen Gefriertechnik an (STEPONKUS *et al.*, 1992; SAKAI, 1995). Die neuen Techniken (Vitrifikationstechniken) sind weniger aufwendig als die bisher verwendeten, da sie keine programmierbare Gefriermaschine erfordern. Auch sind die neuen Techniken geeigneter für das Gefrieren von komplexen Organen, die vielfältige Zelltypen enthalten (ENGELMANN, 1997).

Es werden 7 verschiedene Methoden, die auf Vitrifikation basieren, unterschieden:

Einkapselung-Dehydrierung

Vitrifikation

Einkapselung-Vitrifikation

Trocknung

Vorbehandlung

Vorbehandlung-Trocknung

Tröpfchengefrierung

Einkapselung-Dehydrierungstechnik

Die Methode der Einkapselung-Dehydrierung ist die bekannteste Methode zur Lagerung des Pflanzenmaterials durch Kryokonservierung, weil diese Methode bei vielen pflanzlichen Arten anwendbar ist (SHIBLI, 2000). Die Dehydration von Pflanzenzellen erfolgt durch einen aufeinanderfolgenden osmotische Wasserentzug und Wasserverlust durch Verdunstung (SWAN *et al.*, 1999). Bei dieser Methode wird Saccharose als Osmotikum eingesetzt, damit die giftige Wirkung von anderen Gefrierschutzmitteln wie Dimethylsulfoxid (DMSO) und Glycerol vermieden werden kann (URAGAMI *et al.*, 1990; FABRE & DEREUDDRE, 1990; PLESSIS *et al.*, 1991; NIINO & SAKAI, 1992; MARTÍNEZ *et al.*, 1999; SHIBLI *et al.*, 1999). Die Erholung der so vorbereiteten Sprossspitzen nach dem Einfrieren und der Lagerung war immer direkt und schnell (PAULET *et al.*, 1993; ENGELMANN, 1997; WU *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2000). Außerdem ist die Einkapselung-Dehydrierungstechnik leichter durchzuführen als die Vitrifikationstechnik (NIINO & SAKAI, 1992; SAKAI *et al.*, 2000).

Die Einkapselung-Dehydration wurde zuerst durch FABRE & DEREUDDRE (1990) für die Kryokonservierung von *Solanum*-Sprossspitzen beschrieben. In den letzten Jahren hat sich diese Technik etabliert als eine praktische und effiziente Methode zur Kryokonservierung von Meristemen, somatischen Embryonen oder Zellsuspensionen eines breiten Spektrums von Pflanzen-Arten (NIINO & SAKAI, 1992; BLASKESLEY *et al.*, 1995; BACHIRI *et al.*, 1995). Diese Technik wurde zur Kryokonservierung der Sprossspitzen holziger Pflanzen wie *Malus* (NIINO & SAKAI, 1992; WU *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 1999), *Morus bombysis* (NIINO & SAKAI, 1992), *Pyrus* (NIINO & SAKAI, 1992), *Rosa multiflora* (LYNCH *et al.*, 1996) und *Vitis vinifera* (PLESSIS *et al.*, 1991, 1993) angewandt.

Die Methode der Einkapselung-Dehydration beinhaltet die folgenden, aufeinanderfolgenden Schritte: Einkapselung, Vorbehandlung, Dehydration, Gefrieren, Tauen und Erholung. Die Vorbehandlung, die die Dehydrierung des Pflanzengewebes einleitet, wird auf einem festen oder mit Saccharose angereicherten flüssigen Medium durchgeführt. Einkapselte Nodiensegmente von *Morus bombysis* (NIINO & SAKAI, 1992) und *Vitis vinifera* (WANG *et al.*, 2000) wurden täglich auf ein neues Medium mit einer progressiven Zunahme der Saccharosekonzentration transferiert, um die Dehydration zu initiieren (NIINO & SAKAI, 1992). Diese Vorbehandlung konnte auch mit flüssigem Medium (0,3-1,5 M Saccharose) für 16h (NIINO & SAKAI, 1992) oder 10d (FABRE & DEREUDDRE, 1990) durchgeführt

werden. Die progressive Zunahme der Saccharosekonzentration als Vorbehandlung war schonender für das Pflanzengewebe als die direkte Einwirkung höherer Saccharosekonzentrationen (PLESSIS *et al.*, 1991; POISSONIER *et al.*, 1992; ENGELMANN *et al.*, 1994; MARTÍNEZ *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2000). Der Ersatz von Saccharose durch andere Zucker verbesserte das Überleben des Pflanzenmaterials von *Vitis vinifera* (PLESSIS *et al.*, 1993) und *Humulus lupulus* L. (MARTÍNEZ *et al.*, 1999) nicht.

HITMI *et al.* (1999) zeigten, dass die Vorbehandlung mit Saccharose den Wassergehalt von *Chrysanthemum-cinerariaefolium*-Sprossspitzen verringerte und auch damit ihre Gefriertoleranz verbesserte. Es wird angenommen, dass Saccharose die Plasmamembranen durch das Verdrängen des Wassers von der Membranoberfläche schützt. Dadurch können die Membranproteine bei Austrocknung und Eisbildung stabilisiert werden (SANTARIUS, 1973; CROWE *et al.*, 1987).

Nach der Vorbehandlung mit Saccharose wird der Wassergehalt des Pflanzengewebes weiter gesenkt. Für diesen Schritt wird entweder die Luftströmung in einer Laminarbox genutzt oder die Kapsel an ein Kieselgel gelegt. Die Autoren berichteten, dass es keinen Unterschied in der Wirksamkeit zwischen den beiden Methoden gibt (PAULET *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 2000).

Der Wassergehalt des eingekapselten Pflanzenmaterials vor den Einfrieren in flüssigem Stickstoff (-196°C) spielt eine wichtige Rolle für die Überlebensrate nach dem Auftauen. NIINO & SAKAI (1992), SCOTTEZ *et al.* (1992), VANDENBUSSCHE *et al.* (1993), FUKAI *et al.* (1994) und MARTÍNEZ *et al.* (1999) zeigten, dass bei einem optimalen Wassergehalt der Kapseln die Geschwindigkeit des Einfrierprozesses das Überleben und die Erholung nicht mehr beeinflusst.

Der optimale Wassergehalt hängt von den Pflanzentypen ab, weil diese in ihrer Toleranz gegenüber der Dehydration variieren (WITHERS & ENGELMANN, 1998; WANG *et al.*, 2000). Sehr oft wird der optimale Wassergehalt des künstlichen Samens mit ca. 20% bezogen auf das Frischgewicht angegeben (VANDENBUSSCHE *et al.*, 1993; FUKAI *et al.*, 1994; WITHERS & ENGELMANN, 1998). PLESSIS *et al.* (1991,1993) berichteten, dass die maximale Überlebensrate der kryokonservierten Sprossspitzen von *Vitis vinifera* L. cv. 'Chardonnay' erlangt wurde, wenn der Wassergehalt der eingekapselten Sprossspitzen ca.

20% betrug. WANG *et al.* (2000) erreichten die maximale Überlebensrate der kryokonservierten Sprossspitzen von *Vitis vinifera* jedoch erst, wenn die vorbehandelten Kapseln (beads) einen Wassergehalt von nur 15,6% für die LN33 Hybride und 17,6% für cv. 'Superior' aufwiesen. Auch SUZUKI *et al.* (1998) zeigten, dass hohe Überlebensraten bis zu 90% bei Achselknospen von *Gentiana* erlangt wurden, wenn diese einen Wassergehalt von nur 10% hatten. Die Regenerationsrate von kryokonservierten *Malus*-Sprossspitzen war jedoch auch hoch (70-90%), wenn der Wassergehalt der eingekapselten Sprossspitzen ca. 30% betrug (ZHAO *et al.*, 1999). Auch eingekapselte Nodiensegmente von *Malus*, *Pyrus* und *Morus bombycis* wurden nur bis zu 33% Wassergehalt dehydriert (NIINO & SAKAI, 1992; SCOTTEZ *et al.*, 1992).

Nach der Dehydration werden die eingekapselten Explantaten in flüssigem Stickstoff (-196°C) für 1h eingetaucht. Danach werden die Kapseln schon wieder aufgetaut, wenn man ein schnelles Ergebnis zum Einfluss der gewählten Methode der Kryokonservierung durch die Einkapselung-Dehydrationsmethode haben möchte. Aber selbstverständlich können die künstlichen Samen in flüssigem Stickstoff (-196°C) für eine sehr lange Periode gelagert werden (SCOTTEZ *et al.*, 1992; ENGELMANN, 1997; GONZALEZ-ARNAO *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2000).

Die Lagerung kann in flüssigem Stickstoff (SCOTTEZ, 1993; TANNOURY, 1993) erfolgen. Viele Autoren berichteten jedoch, dass die Pflanzenproben in Tiefkühlmaschinen bei -50 bis zu -70°C gefroren und erhalten werden können. Pflanzenmaterial von *Pyrus* wurde bei -75°C für ein Jahr erhalten (SCOTTEZ, 1993) und Explantate von *Malus*, *Pyrus* und *Morus bombycis* wurden für 5 Monate bei -135°C gelagert (NIINO & SAKAI, 1992).

Schnelles und langsames Tauen sind zwei der bekanntesten Methoden, die für das Auftauen der kryokonservierten Sprossspitzen benutzt werden. Das schnelle Tauen in einem Warmwasserbad bei 37-40°C für 1-3 min verhindert die Eisbildung in den Zellen, die vielleicht während des langsamen Tauens auftreten kann (NIINO & SAKAI, 1992; BHOJWANI & RAZDAN, 1996). Viele Autoren berichteten, dass das schnelle Auftauen in einem Wasserbad bei 40°C für 3 min eine viel höhere Überlebensrate des kryokonservierten Pflanzenmaterials brachte als das langsames Auftauen bei Raumtemperatur für 15 min (NIINO & SAKAI, 1992; BHOJWANI & RAZDAN, 1996; LAMBARDI *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2000).

In manchen Fällen können die Erholungsbedingungen verbessert werden, wie bei *Saccharum spp.*-Hybriden, die eine Woche in Dunkelheit in einem mit Wachstumshormonen behandelten Medium gehalten wurden (PAULET *et al.*, 1993).

Aus dieser Literatur wird deutlich, dass der Erfolg der Einkapselung-Dehydratationstechnik durch mehrere Faktoren beeinflusst wird, wie z.B. der Pflanzenart, dem Pflanzenmaterial (Sprossspitzen oder Achselknospen), der Vorbehandlung zur Dehydrierung (auf einem festen- oder mit Saccharose angereicherten flüssigen Medium, der Saccharosekonzentration, der Vorbehandlungsdauer), dem Wassergehalt des künstlichen Samens vor dem Gefrieren, der Stickstoffbehandlung, dem Auftauen (schnelles Tauen oder langsames Tauen) und den Erholungsbedingungen.

Vitrifikationstechnik

Die Vitrifikation beinhaltet die Behandlung der Proben mit Gefrierschutzmitteln („loading“), Dehydration durch hochkonzentrierte Vitrifizierungslösungen, schnelles Gefrieren, Tauen, Entfernung der Gefrierschutzmittel („unloading“) und die Erholung. Die Explantate werden für 5 bis 90 min in flüssiges Medium gelegt, welches Gefrierschutzsubstanzen wie Saccharose, Glycerol, Ethylenglykol enthält. Das vermindert die Anfälligkeit des Materials gegenüber der hochkonzentrierten Vitrifikationslösung. Die Dehydrationsperiode wird allgemein nach der Größe der Explantate bestimmt. Nach dem schnellen Gefrieren erfolgt ein schnelles Auftauen, um die gefährliche Wiedervereisung zu vermeiden. In einem Wasserbad, bei 20-40°C, wird die Vitrifikationslösung langsam entfernt, um den osmotischen Schock zu reduzieren. Dieses Vitrifikationsverfahren erreicht generell hohe Überlebensraten der Explantate. Es wurde für folgende Pflanzen angewendet: *Allium sativum*, *Camellia sinensis*, *Lilium*, *Citrus*, *Malus*, *Vitis vinifera*, *Morus*, *Solanum tuberosum* und *Wasabia japonica* (ENGELMANN,1997).

Einkapselung-Vitrifikationstechnik

Einkapselung-Vitrifikationstechnik ist eine Kombination aus den beiden oben genannten Methoden. Die Proben werden in Alginatkügelchen eingekapselt und anschließend durch Vitrifikation vorbereitet und gefroren. Die Alginatkapseln reduzieren die schädlichen Einflüsse der Vitrifikationslösung (ENGELMANN,1997).

Trocknungstechnik

Vor dem schnellen Gefrieren wird das Pflanzenmaterial getrocknet. Diese Technik ist einfach und findet hauptsächlich bei zygotischen Embryonen Anwendung. Die Trocknung wird in einer Laminarbox oder mit Hilfe von Silicat-Gel durchgeführt. Eine maximale Überlebensrate wird erlangt, wenn der Wassergehalt der Embryonen 10-20% beträgt (ENGELMANN, 1992; ENGELMANN, 1997). Durch schnelles Gefrieren und langsames Abkühlen werden gute Ergebnisse erreicht (CHAI *et al.*, 1994; NORMAH & MARZALINA, 1995).

Vorbehandlungstechnik

Pflanzenmaterialien werden für eine definierte Zeit (Stunden bis Wochen) unter Mitwirkung von Gefrierschutzmitteln kultiviert. Anschließend erfolgt wiederum schnelles Gefrieren in flüssigem Stickstoff. Diese Vorbehandlung (3-20 Tage) findet auf einem Medium mit hoher Saccharosekonzentration statt. Diese Vorbehandlungstechnik, in Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration und der Dauer der Vorbehandlung, soll zur Verbesserung der Überlebensrate des Materials führen (ENGELMANN, 1997).

Vorbehandlung-Trocknungstechnik

Vorbehandlung-Trocknungstechnik ist wiederum ein Kombinationsverfahren. Nach kurzer Kultivierung auf frostschutzmittelbehandelten Medien werden die Proben teilweise getrocknet und anschließend gefroren. Bei einigen Pflanzenarten konnten nur mäßige Ergebnisse erzielt werden, während die Methode bei somatischen Embryonen der Ölpalme routinemäßig eingesetzt wird (DUMET, 1994).

Tröpfchengefrierung

Explantate (z.B. *Solanum-tuberosum*-Sprossspitzen) werden für 2-3h in DMSO (Dimethylsulfoxid)-angereichertes flüssiges Medium gegeben und dann gefroren. Das Verfahren erbrachte bei 100 verschiedenen *Solanum tuberosum*-Sorten Überlebensraten zwischen 5-100% (SCHÄFER-MENUHR, 1995).

Es sollte abschließend gesagt werden, dass die erfolgreiche Anwendung dieser Techniken nach eigenen Quellen vom störungsfreien Protokollablauf stark beeinflusst wird, so dass die Erreichung hoher Überlebensraten im Einzelfall schwierig sein kann. Es wird auch deutlich, dass die Einkapselung-Dehydrierungstechnik eine praktische und effiziente Methode zur Kryokonservierung von Meristemen, somatischen Embryonen oder Zellsuspensionen eines

breiten Spektrums von Pflanzen-Arten ist. Bei dieser Technik wird Saccharose als Osmotikum eingesetzt, damit die giftige Wirkung von anderen Gefrierschutzmitteln wie Dimethylsulfoxid (DMSO) und Glycerol vermieden werden kann. Der Erfolg dieser Technik kann schwierig sein, weil sie durch mehrere Faktoren beeinflusst wird.

Aus den Quellen wird deutlich, dass die Chancen der Erhaltung der genetischen Ressourcen durch die Anwendung der Alginat-Einkapselungstechnik besser sind als bei der In-situ-, Ex-situ- und In-vitro-Erhaltung und die Alginatkapsel die schädlichen Einflüsse von flüssigem Stickstoff reduzieren kann. Außerdem ist die Kryokonservierung eine ideale Methode zur Langzeitlagerung.

3 Hauptziele der Untersuchungen

Das Ziel dieser Untersuchungen ist es, Methoden zur Einkapselung gärtnerisch wichtiger Kulturen zu entwickeln und dadurch künstliche Samen herzustellen, die für die Konversion in vitro und ex vitro und für die Langzeitlagerung geeignet sind. Beispielhaft wurden für die Untersuchungen zwei Hauptkulturen ausgewählt, *Dendranthema* und *Rosa*, die sich durch unterschiedliche Ansprüche auszeichnen und zugleich wirtschaftlich sehr bedeutend sind.

Es sollten untersucht werden:

- Einfluss des Pflanzenmaterials auf die Konversion
- Gestaltung der optimalen Nährstoffversorgung für die Nodiensegmente:
 - Entwicklung der Gelmatrixzusammensetzung (Na-Alginatkonzentration, Nährstoffe und Wachstumsregulatoren)
 - Optimierung des Einkapselungsprozesses (Härterlösung, Wäsche)
 - Untersuchung der Nährstoffversorgung in den Kugeln
- Einfluss des Substrates auf die Konversion der künstlichen Samen
- Entwicklung einer Samenschale
- Konversion unter unsterilen Bedingungen
- Einkapselung von Nodiensegmenten aus dem Gewächshaus
- Langzeitlagerung der künstlichen Samen bei 24°C, 7°C und 4°C in verschiedenen Lösungen
- Langzeitlagerung der künstlichen Samen bei Einsatz der Kryokonservierung

Um die Übertragbarkeit der Ergebnisse zu prüfen, wurden mehrere *Dendranthema*-Sorten in die Untersuchungen einbezogen.

4 Versuchsmaterial und Untersuchungsmethoden

4.1 Materialbeschreibung

4.1.1 *Dendranthema x grandiflorum* KITAM.

Vier *Dendranthema*-Sorten wurden in diesen Untersuchungen verwendet. *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' und 'Snowdon Weiß' werden als Schnittblumen verwendet und die Sorten *Dendranthema x grandiflorum* 'Topfweiß' und 'Garden mum' als Topfpflanzen.

Schnitt-Chrysanthemen

Dendranthema x grandiflorum KITAM., 'PS 27'

Der Klon 'PS 27' zeigt einen uniformen und starken Wuchs. Die kleinen und einfachen Blumen sind rein rosa mit frischgrüner Mitte (Abb. 2a). Dieser Klon wurde freundlicherweise von Dr. Knuth (FG Pflanzenzüchtung des Instituts für Gartenbauwissenschaften der HU Berlin) zur Verfügung gestellt.

Dendranthema x grandiflorum KITAM., 'Snowdon Weiß'

Die Sorte 'Snowdon Weiß' blüht reinweiß, mit mittelgroßen, ballförmigen Blumen in der Regel als Normalkultur zu Allerheiligen. Sie zeigt einen kräftigen bis starken Wuchs und eine schnelle Reaktion (Abb. 2b).

Topf-Chrysanthemen

Dendranthema x grandiflorum KITAM., 'Topfweiß'

Die Sorte 'Topfweiß' blüht reinweiß mit einfachen Blumen in einem gleichmäßigen Spray in der Regel als Normalkultur zu Allerheiligen. Sie hat einen uniformen, mittelstarken Wuchs (Abb. 2c). 'Topfweiß' ist eine schöne Topfsorte.

Dendranthema x grandiflorum KITAM., 'Garden mum'

Die Sorte 'Garden mum' hat kleine, einfache, leuchtendgelbe Blumen und trägt viele Knospen. Sie blüht in der Regel als Normalkultur zu Allerheiligen mit ca. 15-35 Lieferwochen. Diese Sorte wächst uniform und mittelstark (Abb. 2d). Das Wachstum ist schneller als 'Topfweiß'. Eine schöne Topfsorte.



a) 'PS 27'



b) 'Snowdon Weiß'



c) 'Topfweiß'



d) 'Garden mum'

Abb. (2): *Dendranthema x grandiflorum*-Sorten



Abb. (3): *Rosa hybrida* 'Kardinal'

4.1.2 *Rosa hybrida* 'Kardinal'

Die dunkelrot blühende Sorte 'Kardinal' (*Rosa hybrida* 'Kardinal', Abb. 3) ist eine großblumige Sorte und hat eine große wirtschaftliche Bedeutung als Schnittblume. Wachstum und Entwicklung sind auch unter Gewächshausbedingungen deutlich von der Strahlung abhängig. Die Sorte 'Kardinal' blüht in der lichtreichen Jahreszeit und gehört zu den tageslängen-unabhängig, autonom induzierenden Kultivaren.

4.2 Anzucht des Pflanzenmaterials

Ca. 10 mm lange Nodiensegmente waren als Explantate von Mutterpflanzen von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27', 'Snowdon Weiß', 'Topfweiß' und 'Garden mum' und *Rosa hybrida* 'Kardinal' entnommen worden. Die Nodiensegmente waren mit 3% Kalziumhypochlorid mit Tween 20 für 20 min desinfiziert worden, dann waren die Explantate dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen worden.

Die Sprosskulturen von *Dendranthema x grandiflorum* 'Topfweiß' und *Rosa hybrida* 'Kardinal' wurden auf einem modifizierten MS-Medium (MURASHIGE & SKOOG, 1962) kultiviert. Dieses MS-Medium hatte folgende Inhaltsstoffe: Makro- und Mikronährstoffe nach MURASHIGE & SKOOG (1962, MS), 2,5 mg/l Thiamin-HCl, 0,2 mg/l Pyridoxin-HCl, 0,2 mg/l Biotin, 30 g/l Saccharose, 100 mg/l myo-Inositol, sowie Wachstumsregulatoren in Form von 0,25 mg/l BAP (6-Benzylaminopurin) und 0,5 mg/l GA₃ (Gibberellinsäure). Die Sprosskulturen von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27', 'Snowdon Weiß' und 'Garden mum' wurden auf einem modifizierten MS-Medium kultiviert, das die Hälfte der Makrosalzmenge und 0,5 mg/l BAP (6-Benzylaminopurin) enthielt. Die Agarkonzentration (Agar Agar SERVA Kobe 1, SERVA Electrophoresis GmbH) betrug 8 g/l. Der pH-Wert wurde auf 5,8 mit NaOH und HCl eingestellt. Die Medien wurden bei 121°C und 1,2 bar für 15 min autoklaviert. Alle 6 Wochen waren Subkulturen mit 5 bis 10 mm langen Nodiensegmenten durchgeführt worden.

Für die Einkapselung waren 4 - 5 mm lange Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27', 'Snowdon Weiß', 'Topfweiß' und 'Garden mum' nach 5 Wochen Subkulturdauer entnommen worden. Die 4 - 5 mm langen Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal' waren nach 5 und 3 Wochen Subkulturdauer für die Einkapselung entnommen worden.

4.3 Allgemeine Kulturbedingungen im Wachstumsraum und im Gewächshaus

Die Sprosskulturen (Stammkulturen) wuchsen im Wachstumsraum unter 16 h/d Weißlicht (OSRAM L 58 W/30, PAR 35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) und bei $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Die künstlichen Samen wurden im Wachstumsraum unter den gleichen Bedingungen kultiviert.

Die Mutterpflanzen der *Dendranthema x grandiflorum*-Sorten und die *Rosa hybrida* 'Kardinal'-Mutterpflanzen wuchsen im Gewächshaus in Plastiktöpfen (25 cm) in einem Torf + Perlit + Sand-Substrat (3:1:1). Die Temperatur betrug im Gewächshaus ca. 26°C . Wasser und Wuxal (AGLUCON GmbH) waren den Pflanzen regelmäßig gegeben worden.

4.4 Die Einkapselungsmethode

Von den etablierten Stammkulturen waren Nodiensegmente (ca. 4 - 5 mm Länge) isoliert worden. Die Nodiensegmente wurden, wenn nicht anders ausgewiesen, gut mit 3% Na-Alginat („Fluka Chemie AG CH-9470 Buchs“) gemischt (Abb. 4), mit einer Pipette aufgenommen und in die Härterlösung (75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) getropft, und für 30 min auf einen Schüttler gestellt. Dann waren die Kugeln dreimal mit destilliertem Wasser (jeweils ca. 20 Sec.) gewaschen worden. Danach waren die Kapseln auf dem Konversionssubstrat kultiviert worden (Abb. 5). Der pH-Wert war auf 5,8 in allen Medien und Lösungen eingestellt worden.

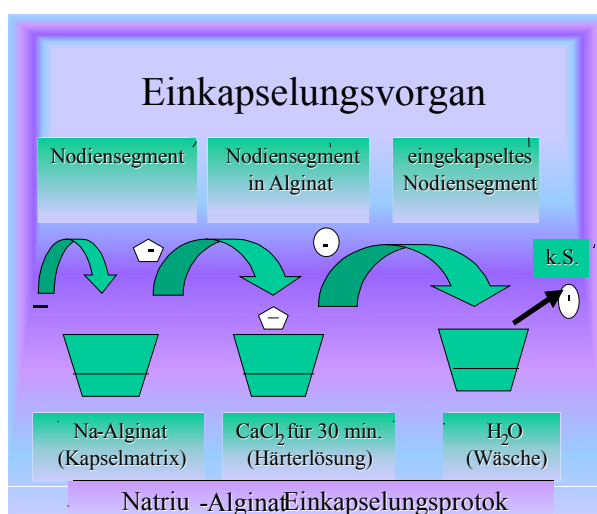


Abb. (4): Die Einkapselungsmethode.



Abb. 5: Eingekapselte Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum*.

4.5 Datenerhebung und Auswertung

Die Daten für die Sprossbildung und Bewurzelung der künstlichen Samen (k. S.) wurden nach 1, 3, 5 und 8 Wochen registriert. Als Sprossbildung war die Zunahme der Größe des Nodiensegments und das Durchbrechen der Kapsel mit einem grünen Blatt bzw. Spross gewertet worden. Das eingekapselte Nodiensegment, das wenigstens eine Wurzel gebildet hatte, wurde als bewurzelt betrachtet.

- Die Anzahl der künstlichen Samen mit Sprossbildung bestimmte man folgendermaßen:

$$\text{Sprossbildung (\%)} = \frac{\text{Anzahl der eingekapselten Nodiensegmente mit Blättern bzw. Sprossen}}{\text{Gesamtanzahl der eingekapselten Nodiensegmente}} \times 100$$

- Die Anzahl der künstlichen Samen mit Wurzelbildung bestimmte man folgendermaßen:

$$\text{Bewurzelung (\%)} = \frac{\text{Anzahl der eingekapselten, bewurzelten Nodiensegmente}}{\text{Gesamtanzahl der eingekapselten Nodiensegmente}} \times 100$$

- Die Konversion war folgendermaßen bestimmt worden:

$$\text{Konversion (\%)} = \frac{\text{Anzahl der eingekapselten Nodiensegmente mit Spross und Wurzel}}{\text{Gesamtanzahl der eingekapselten Nodiensegmente}} \times 100$$

- Die Kontamination der eingekapselten Nodiensegmente war mit folgender Formel berechnet worden:

$$\text{Kontamination (\%)} = \frac{\text{Anzahl der eingekapselten, infizierten Nodiensegmente}}{\text{Gesamtanzahl der eingekapselten Nodiensegmente}} \times 100$$

Kontamination heißt Wachstum und Vermehrung von Mikroorganismen auf den künstlichen Samen.

- Der prozentuale Wassergehalt in den Kugeln war mit folgender Formel berechnet worden:

$$\text{Wassergehalt (WG) \%} = \frac{\text{FM-TM}}{\text{FM}} \times 100$$

FM = Frischmasse des künstlichen Samens nach der Dehydration.

TM = Trockenmasse des künstlichen Samens nach der Dehydration nach 3d Trocknung bei 80°C.

- Die Vitalität der künstlichen Samen bestimmte man folgendermaßen:

$$\text{Vitalität \%} = \frac{\text{Anzahl der künstlichen, lebenden Samen}}{\text{Gesamtanzahl der künstlichen Samen}} \times 100$$

Die künstlichen Samen waren als vital betrachtet worden, wenn die eingekapselten Nodiensegmente noch grün geblieben waren.

Pro Versuchsvariante waren 30 Kapseln (10 Kapseln/Babyglas bzw. Erlenmeyerkolben oder Topf) verwendet worden (Abb. 5).

Jedes Experiment war zwei Mal wiederholt worden. Alle Daten wurden mit dem Programm SPSS 9.0 (PC) analysiert und die Überprüfung der sich zwischen den Varianten ergebenden Unterschiede auf Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests und des exakten Tests nach Fisher (Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,05$). Unterschiedliche Buchstaben in den Tabellen und Abbildungen weisen signifikante Unterschiede aus.

4.6 Versuchsdurchführung

Es wurden Experimente zu folgenden Fragestellungen durchgeführt:

- Qualität des Pflanzenmaterials bei *Dendranthema* und *Rosa*
 - Einfluss der Subkulturdauer
 - Einfluss der Position der Explantate am Spross
- Entwicklung der Kapsel-Zusammensetzung für *Dendranthema*
 - Einfluss der Na-Alginatkonzentration
 - Einfluss der Gelmatrixkomponenten (MS Salze und Zucker)
 - Einkapselungsmethoden
 - Nährstoffverluste
 - Einfluss von Wachstumsregulatoren
 - Vergleich der Reaktion von *Dendranthema*-Sorten
- Entwicklung der Kapsel-Zusammensetzung für *Rosa*

- Einfluss der Wachstumsregulatoren
- Einfluss der Saccharosekonzentration
- Einfluss der Kapselgröße
- Verbesserung der Konversion der eingekapselten Nodiensegmente von *Rosa*
- Einfluss des Substrates auf die Konversion unter sterilen Bedingungen
- Einfluss einer zweiten Kapselschicht auf die Konversion von *Dendranthema* auf einem Agar-Wasser-Medium
- Konversion unter unsterilen Bedingungen
- 7Einkapselung von Nodiensegmenten aus dem Gewächshaus
- Langzeitlagerung
 - Bei niedrigen Temperaturen über 0°C
 - Kryokonservierung (Einkapselung-Dehydration)

4.6.1 Qualität des Pflanzenmaterials

4.6.1.1 Einfluss der Subkulturdauer

- *Pflanzenmaterial*: Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' (ca. 4 - 5 mm lang).
- *Alter des Pflanzenmaterials*: Entnahme der Nodiensegmente nach 5, 6, 7 und 8 Wochen Subkulturdauer.
- *Nodiensegmententyp*: Nodiensegmente und Sprossspitzen.
- *Einkapselung*: keine.
- *Konversionssubstrat*: hormonfreies MS-Medium.

4.6.1.2 Einfluss der Position der Explantate am Spross

***Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'**

- *Pflanzenmaterial*: Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' (ca. 4-5 mm lang).
- *Alter des Pflanzenmaterials*: Entnahme der Nodiensegmente nach 5 Wochen Subkulturdauer.
- *Position der Explantate am Spross*: 1- Sprossspitze, 2-, 3-, 4- und 5- Nodiensegmente (von oben nach unten).
- *Einkapselung*: keine.
- *Konversionssubstrat*: hormonfreies MS-Medium.

***Rosa hybrida* 'Kardinal'**

- *Pflanzenmaterial*: Nodiensegmente (ca. 4 - 5 mm lange) von *Rosa hybrida* 'Kardinal'.
- *Alter des Pflanzenmaterials*: Entnahme der Nodiensegmente nach 5 Wochen Subkulturdauer.
- *Position der Explantate am Spross*: Sprossspitze, Sprossmitte und Sprossbasis.
- *Gelmatrixkomponenten (3% Na-Alginat)*: MS-Medium mit Auxin.
- *Härterlösung*: 75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ mit den gleichen Komponenten der Gelmatrix.
- *Konversionssubstrat*: Agar mit destilliertem Wasser.

4.6.1.3 Konversion eingekapselter Nodiensegmente

- *Pflanzenmaterial*: 4 mm lange Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'.
- *Gelmatrix*: 2% Na-Alginat mit destilliertem Wasser.
- *Härterlösung*: 75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ mit destilliertem Wasser.
- *Wäsche*: mit destilliertem Wasser, drei Mal.
- *Konversionssubstrate*: Agar mit destilliertem Wasser,
Agar mit hormonfreiem MS-Medium,
Perlit mit destilliertem Wasser (12 ml/Glas),
Perlit mit hormonfreiem MS-Medium (12 ml/Glas).

4.6.2 Entwicklung der Kapsel-Zusammensetzung für *Dendranthema*

4.6.2.1 Einfluss der Na-Alginatkonzentration

- *Pflanzenmaterial*: 4 mm lange Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'.
- *Gelmatrix*: Na-Alginat mit 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5% und 4,0% in destilliertem Wasser.
- *Härterlösung*: 75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ mit destilliertem Wasser.
- *Wäsche*: mit destilliertem Wasser, drei Mal.
- *Konversionssubstrat*: MS + 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBS.

4.6.2.2 Einfluss der Nährstoffe

Nährstoffzugabe zur Kapsel

- *Pflanzenmaterial*: 4 mm lange Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'.
- *Gelmatrix*: 3% Na-Alginat \pm 3% Saccharose,
3% Na-Alginat + 0,5 MS + Vit. \pm 3% Sacc,
3% Na-Alginat + MS + Vit. \pm 3% Sacc.
- *Härterlösung*: 75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mit destilliertem Wasser.
- *Wäsche*: mit destilliertem Wasser, drei Mal.
- *Konversionssubstrat*: Agar mit destilliertem Wasser.

Methoden der Einkapselung

Vier verschiedene Methoden für die Einkapselung von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'-Nodiensegmenten wurden miteinander verglichen.

Tab. (11): Varianten zur Prüfung der Wirkung der Einkapselungsmethoden auf die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'.

Varianten	Gelmatrix (3% Na-Alginat)	Härterlösung (75mM CaCl_2)	Wäsche	Konversionssubstrat
1	hormonfreies MS-Medium	mit Wasser	mit Wasser	Agar + W.
2	hormonfreies MS-Medium	mit Wasser	MS-Lösung	s.o.
3	hormonfreies MS-Medium	mit MS-Lösung	ohne Wäsche	s.o.
4	Wasser	Ca-freies MS	ohne Wäsche	s.o.

Nährstoffverluste

- *Pflanzenmaterial*: keines.
- *Gelmatrix*: 3% Na-Alginat + MS-Medium (0,085 ml/Kugel).
- *Härterlösung*: 75 mM $\text{Ca Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + MS-Medium.
- *Wäsche*: mit vollem MS-Medium.

10 Kugeln wurden auf 25 ml eines Agar-Wasser-Medium (8 g/l Agar) pro Erlenmeyerkolben (100 ml) aufgesetzt. Der Nitratgehaltes der Kapseln wurde alle 24

Stunden bis zum 7. Tag ermittelt. 60 Kapseln pro Probe (3 Proben/Variante) wurden dafür täglich zur NO_3^- -Messung entnommen. Diese Kapseln wurden in destilliertes Wasser ($\text{pH} = 5,8$) gelegt und ein Endvolumen von 100 ml eingestellt. Die Kapseln waren für 3 Stunden auf dem Schüttler bewegt worden. Als Kontrollvariante wurden 60 Kapseln direkt nach der Kapselherstellung ausgewaschen.

Die Nitratmessung erfolgte in der wässrigen Lösung mit einer Nitrat-selektiven Elektrode (Ingold-Firma). Zur Stabilisierung der Messlösung und zum Ausschalten störender Ionen wurde vor der NO_3^- -Messung 2 ml TISAB der Messlösung zugesetzt.

Es ist bekannt, dass die Makro MS-Lösung 24,25 g/l NO_3^- enthält, daher enthielten 60 Kugeln (5,1 ml) 123,675 mg/l NO_3^- (errechneter NO_3^- -Gehalt).

4.6.2.3 Einfluss von Wachstumsregulatoren

Pflanzenmaterial: Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'.

Tab. (12): Varianten zur Untersuchung des Einflusses von IES und BAP auf die Konversion der künstlichen Samen von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'.

Varianten	Gelmatrix (3% Na-Alginat)	Härterlösung (75mM CaCl_2)	Wäsche	Konversionssubstrat
1	mit MS	In MS-Lösung	gleiche Komp.	Agar + Wasser
2	MS + 0,01 mg/l IES	gleiche Komp.	gleiche Komp.	s.o.
3	MS + 0,02 mg/l IES	„ „	„ „	s.o.
4	MS + 0,05 mg/l IES	„ „	„ „	s.o.
5	MS + 0,1 mg/l IES	„ „	„ „	s.o.
6	MS + 0,2 mg/l IES	„ „	„ „	s.o.
7	MS + 0,5 mg/l IES	„ „	„ „	s.o.
8	MS + 1,0 mg/l IES	„ „	„ „	s.o.
9	MS + 0,2 mg/l BAP	„ „	„ „	s.o.
10	MS + 0,2 mg/l BAP + 0,01 mg/l IES	„ „	„ „	s.o.
11	Kontrolle (Nodiensegmente ohne Einkapselung)			Hormonfreies MS

4.6.2.4 Übertragung der Ergebnisse auf weitere *Dendranthema*-Sorten

- *Pflanzenmaterial*: Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum*-Sorten ('PS 27', 'Snowdon Weiß', 'Topfweiß', 'Garden mum').
- *Gelmatrix*: 3% Na-Alginat mit MS + 1,0 mg/l IES bzw. + 1,0 mg/l IES + 0,5 mg/l GA₃ bzw. 1,0 mg/l IES + 0,2 mg/l BAP.
- *Härterlösung*: identisch mit Gelmatrixkomponenten.
- *Wäsche*: mit Gelmatrixkomponenten.
- *Konversionssubstrat*: Agar mit destilliertem Wasser.

4.6.3 Entwicklung der Kapsel-Zusammensetzung für *Rosa*

Pflanzenmaterial: ca. 4 - 5 mm lange Nodiensegmente von Rose 'Kardinal'.

Gelmatrix: 3% Na-Alginat + volles MS-Medium.

Härterlösung: 75 mM CaCl₂ x 2H₂O + volles MS-Medium.

Konversionssubstrat: Agar mit destilliertem Wasser.

Bei allen Experimenten waren die Hauptbestandteile für die Gelmatrix und Härterlösung gleich. Variationen gab es nur bei der Zugabe der Zusatzbestandteile Saccharose und den Wachstumsregulatoren.

Zusatzbestandteile bei den einzelnen Experimenten:

4.6.3.1 Einfluss von Wachstumsregulatoren

Es wurden verschiedene Wachstumsregulatoren (BAP, GA₃ und IBS) mit verschiedenen Konzentrationen der Gelmatrix und der Härterlösung zugesetzt (Tab. 13, 14).

Tab. (13): Varianten zur Prüfung des Einflusses von Wachstumsregulatoren auf die Konversion der künstlichen Samen von *Rosa hybrida* 'Kardinal'.

Variante	Saccharose (g/l)	BAP (mg/l)	GA ₃ (mg/l)	IBS (mg/l)
1	30	0,25	0,5	
2	30	0,5	0,5	
3	30			0,2
4	30			0,5
5	30	0,5		0,2

Tab. (14): Varianten zur Untersuchung des Einflusses von IBS und NES auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal'.

Variante	Saccharose (g/l)	IBS (mg/l)	NES (mg/l)
1	30	2	
2	30	1,5	0,3
3	30	1,5	0,2
4	30	0,5	0,4
5	30		0,5

4.6.3.2 Einfluss der Saccharosekonzentration

Tab. (15): Varianten zur Prüfung des Einflusses der Saccharosekonzentration auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal'.

Variante	Saccharose (g/l)	IBS (mg/l)
1	10	1
2	20	1
3	30	1
4	40	1
5	50	1
6	60	1
7	70	1
8	80	1
9	90	1

4.6.3.3 Einfluss der Kapselgröße

Es wurde eine 1 ml Mikropipette verwendet und die Pipettenspitze auf eine Länge von 4,5 cm, mit einem Durchmesser von 0,5 cm gekürzt. Das Volumen wurde auf 0,075 ml und 0,085 ml eingestellt, um zu testen, ob das Kapselvolumen die Entwicklung der Nodiensegmente beeinflusst.

Tab. (16): Varianten zur Untersuchung des Einflusses der Kapselgröße auf die Spross- und Wurzelbildung von *Rosa hybrida* 'Kardinal'.

Variante	Saccharose (g/l)	Kapselgröße (ml)	IBS (mg/l)	NES (mg/l)
1	30	0,075	2	
2	30	0,085	2	
3	30	0,075	0,5	0,4
4	30	0,085	0,5	0,4

4.6.3.4 Verbesserung der Konversion der künstlichen Samen von *Rosa*

Es wurden in diesem Experiment Nodiensegmente nach 3 Wochen Kulturdauer für die Einkapselung verwendet. Zwei Saccharosekonzentrationen (80 und 90 g/l) mit zwei Auxinen (IBS und NES) wurden für die Verbesserung der Konversion der eingekapselten Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal' geprüft.

Tab. (17): Varianten zur Untersuchung der Wirkung von Gelmatrixkomponenten (Saccharose und Hormone) auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal'.

Variante	Saccharose (g/l)	IBS (mg/l)	NES (mg/l)
1	80	2	
2	80	0,5	0,4
3	90	2	
4	90	0,5	0,4

4.6.4 Einfluss des Substrates auf die Konversion unter sterilen Bedingungen

- *Pflanzenmaterial*: Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'.
- *Gelmatrix*: 3% Na-Alginat + volles MS + 1,0 mg/l IES.
- *Härterlösung*: identisch mit Gelmatrixkomponenten.
- *Wäsche*: mit Gelmatrixkomponenten.
- *Konversionssubstrat*:
 - Agar mit destilliertem Wasser,
 - Sand mit destilliertem Wasser,
 - Kies mit destilliertem Wasser,
 - Perlit mit destilliertem Wasser,
 - Vermiculit mit destilliertem Wasser.

Kultivierung von *Dendranthema*-Sorten auf Sand

- *Pflanzenmaterial*: Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum*-Sorten ('PS 27', 'Snowdon Weiß', 'Topfweiß' und 'Garden mum').
- *Gelmatrix*: 3% Na-Alginat + volles MS + 1,0 mg/l IES.
- *Härterlösung*: 75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ mit den gleichen Gelmatrixkomponenten.
- *Wäsche*: mit den gleichen Gelmatrixkomponenten.
- *Konversionssubstrat*: Sand mit destilliertem Wasser.

Zehn weitere *Dendranthema x grandiflorum*-Sorten ('Snowdon Weiß', 'Bronze', 'Minstrel', 'Miral', 'Trumpf', 'Tauben', 'Branglow', 'Branbeach', 'Evelyn' und 'Majola') wurden bei Zugabe des vollen MS-Mediums + 1,0 mg/l IES zur Gelmatrix, zur Härterlösung und zur Wäsche eingekapselt, dann wurden die eingekapselten Nodiensegmente auf einem Agar- und Sand-Wasser-Medium kultiviert.

4.6.5 Einfluss einer zweiten Kapselschicht auf die Konversion

Pflanzenmaterial: Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'.

Tab. (18): Entwicklung der Samenschale unter sterilen Bedingungen.

Samenschalen (3% Na-Alginat)		Härterlösung (75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) und Wäsche	Konversions-substrat
Gelmatrix der ersten Schicht	Gelmatrix der zweiten Schicht		
MS + 1,0 mg/l IES + Knospe	-----	mit den gleichen Gelmatrixkomponenten	Agar + W.
MS + 1,0 mg/l IES	Alginat + W. + Knospe	mit den gleichen Gelmatrixkomponenten in der ersten Schicht oder zweiten Schicht	s.o.
s.o.	Alginat + MS Salze + Knospe	„ „	s.o.
s.o.	Alginat + W. + 0,2 M Mannitol + Knospe	„ „	s.o.
s.o.	Alginat + MS Salze + 0,2 M Mannitol + Knospe	„ „	s.o.
s.o.	Alginat + W. + 0,2 M Mannitol + 0,5 g/l Aktivkohle + Knospe	„ „	s.o.
s.o.	Alginat + MS Salze + 0,2 M Mannitol + 0,5 g/l Aktivkohle + Knospe	„ „	s.o.
MS + 1,0 mg/l IES + Knospe	Flüssig Paraffin	„ „	s.o.

4.6.6 Konversion der künstlichen Samen unter unsterilen Bedingungen

Pflanzenmaterial: Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'.

Die Varianten: Die gleichen letzten Samenschalenvarianten (Tab. 18).

Kulturbedingungen: Die k. S. wurden auf einem unsterilen Perlit-Substrat in Plastiktöpfen (7 cm) kultiviert. Die Töpfe wurden im Wachstumsraum in eine Plastikschiene mit der Bedeckung durch eine Glasplatte gestellt. Die Plastikschiene enthielt unsteriles Leitungswasser (ca. 5 mm hoch). Dieses Wasser wurde 2 Mal pro Woche gewechselt. Die k. S. wuchsen im Wachstumsraum unter unsterilen Bedingungen mit 16h/d Weißlicht (OSRAM L 58 W/30) und $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.6.7 Einkapselung von Nodiensegmenten aus dem Gewächshaus

4.6.7.1 Einfluss der Gelmatrixkomponenten

- *Pflanzenmaterial*: Sprosse (10-12 cm Länge) wurden von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' Gewächshausmutterpflanzen isoliert.
- *Desinfektionsmethode*: Die Nodiensegmente wurden mit 3% Kalziumhypochlorid mit Tween 20 für 10 min desinfiziert, dann wurden die Nodiensegmente dreimal mit destilliertem Wasser (jeweils ca. 20 Sec.) gewaschen.
- *Gelmatrix*: 3% Na-Alginat + volles MS + IES bei 1, 2, 3, 4, 5 mg/l).
- *Härterlösung*: 75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ mit den gleichen Gelmatrixkomponenten.
- *Wäsche*: mit den gleichen Gelmatrixkomponenten.
- *Konversionssubstrat*: Agar mit destilliertem Wasser in Röhrchen (1 Samen/Röhrchen).

4.6.7.2 Übertragung der Ergebnisse auf andere *Dendranthema*-Sorten

- *Pflanzenmaterial*: Sprosse von 10-12 cm Länge waren von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27', 'Snowdon Weiß', 'Topfweiß' und 'Garden mum' Gewächshausmutterpflanzen isoliert worden.
- *Desinfektionsmethode*: Die Nodiensegmente waren mit 3% Kalziumhypochlorid mit Tween 20 für 10 min desinfiziert worden, dann wurden die Nodiensegmente dreimal mit destilliertem Wasser (jeweils ca. 20 Sec.) gewaschen.
- *Gelmatrix*: 3% Na-Alginat + volles MS + 4,0 mg/l IES gemischt.
- *Härterlösung*: 75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ mit den gleichen Gelmatrixkomponenten.
- *Wäsche*: mit den gleichen Gelmatrixkomponenten.
- *Konversionssubstrat*: Agar mit destilliertem Wasser in Röhrchen (1 Samen/Röhrchen).

4.6.8 Lagerung der künstlichen Samen

4.6.8.1 Lagerung bei niedrigen Temperaturen (über 0°C)

Einfluss der Lagerungstemperatur

- *Pflanzenmaterial*: *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'.
- *Gelmatrix*: 3% Na-Alginat + volles MS + 1,0 mg/l IES.
- *Härterlösung*: 75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ mit den gleichen Gelmatrixkomponenten.
- *Wäsche*: mit den gleichen Gelmatrixkomponenten.
- *Lagerungstemperatur*: bei Raumtemperatur ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), 7°C und 4°C
- *Lagerungslösung*: volles MS + 1,0 mg/l IES.

Einfluss des Lagerungsmediums

- *Pflanzenmaterial*: *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'.
- *Gelmatrix*: 3% Na-Alginat + volles MS + 1,0 mg/l IES.
- *Härterlösung*: 75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ mit den gleichen Gelmatrixkomponenten.
- *Wäsche*: mit den gleichen Gelmatrixkomponenten.

Tab. (19): Lagerung der künstlichen Samen von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' in verschiedenen Lagerungslösungen unter 4°C .

Varianten	Lagerungslösungen	Lagerungstemperatur
1	Mineralöl (Paraffin)	4°C
2	volles MS + 1,0 mg/l IES	
3	MS + 1,0 mg/l IES + 0,5 M Mannitol	
4	MS + 1,0 mg/l IES + 1,0 M Mannitol	

4.6.8.2 Kryokonservierung (Einkapselung-Dehydrierung)

Einfluss der Saccharosekonzentrationen (Vorbehandlung)

- *Pflanzenmaterial*: *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'.
- *Gelmatrix*: volles MS + 1,0 mg/l IES.
- *Härterlösung*: 75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ mit den gleichen Gelmatrixkomponenten.
- *Wäsche*: mit den gleichen Gelmatrixkomponenten.
- *Vorbehandlung*: Die Kugeln waren auf vollem MS-Medium mit einer progressiven Zunahme der Saccharosekonzentration als Vorbehandlung kultiviert worden.

- *Dehydration*: Die Kugeln waren auf einem sterilen Filterpapier in eine Petrischale gelegt worden. Die Dehydrierung war bei Lufttrockenheit in einer Laminarbox für 7 Stunden durchgeführt worden.
- *Konversionssubstrat*: Einige Kugeln (30 Kugeln) waren nach 7h in der Laminarbox auf vollem MS-Medium kultiviert worden.
- *Wassergehalt*: Die verbliebenen Kugeln (50 Kugeln) wurden nach 7h in einer Laminarbox als Frischgewicht gewogen, dann waren die Kugeln in einen Trockenschrank bei 80°C für 3d gelegt worden. Danach waren die Kugeln zur Bestimmung des Trockengewichts gewogen worden.

Tab. (20): Varianten zur Untersuchung der Wirkung der progressiven Zunahme der Saccharosekonzentration (Vorbehandlung) auf den Wassergehalt und die Sprossbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'.

Varianten	Progressive Zunahme der Saccharosekonzentration	
	Saccharosekonzentrationen	Dauer
1	0,2 M	24h
	0,4 M	24h
2	0,2 M	24h
	0,4 M	24h
	0,7 M	24h
3	0,2 M	24h
	0,4 M	24h
	0,7 M	24h
	1,0 M	24h

Einfluss der Dehydrierungsdauer

- *Pflanzenmaterial*: *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'.
- *Gelmatrix*: volles MS + 1,0 mg/l IES.
- *Härterlösung* : 75 mM CaCl₂ x 2H₂O mit den gleichen Gelmatrixkomponenten.
- *Wäsche*: mit den gleichen Gelmatrixkomponenten.
- *Vorbehandlung*: Die Kugeln waren auf vollem MS-Medium mit einer progressiven Zunahme in Saccharosekonzentration (0,2 M, 0,4 M, 0,7 M und 1,0 M Sacc. für 24h pro Konzentration) kultiviert worden.

- *Dehydration:* Nach der Behandlung mit Saccharose waren die Kugeln in die Laminarbox für 6h, 7h und/oder 9h gelegt worden.
- *Wassergehalt:* 50 Kugeln wurden nach der Dehydrationsdauer in der Laminarbox als Frischgewicht gewogen, dann waren die Kugeln in den Trockenschrank bei 80°C für 3d gelegt worden. Danach wog man die Kugeln zur Bestimmung des Trockengewichts.
- *Stickstoffbehandlung:* 30 Kugeln pro Dehydrationsdauer waren für 1h in flüssigen Stickstoff gelegt worden.
- *Tauen:* Nach der Stickstoffbehandlung wurden die Kugeln ins Warmwasserbad bei 40°C für 3-4 min gelegt.
- *Erholung:* Für die Konversion der k. S. kultivierte man die Samen auf vollem MS-Medium in der Dunkelheit bei 24°C für eine Woche. Danach waren die Gläser mit den Samen in den Wachstumsraum transportiert worden.

5 Ergebnisse

5.1 Qualität des Pflanzenmaterials

5.1.1 Einfluss der Subkulturdauer

Die Dauer der Subkultur (Alter des Pflanzenmaterials) hatte einen klaren Einfluss auf die Konversion der nicht eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' (Abb. 6). Nodiensegmente, die nach 5 Wochen Subkulturdauer für die Versuche entnommen wurden, hatten nach einer Woche schon zu 68,3% austreibende Knospen und nach 3 Wochen hatten 93,3% der Nodien Sprosse gebildet. Die Sprossbildung nahm ab, wenn die Subkulturdauer zunahm. Nach 5 Wochen Kulturdauer gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Sprossbildung zwischen dem jüngeren und älteren Pflanzenmaterial mehr, da alle Nodiensegmente Sprosse gebildet hatten.

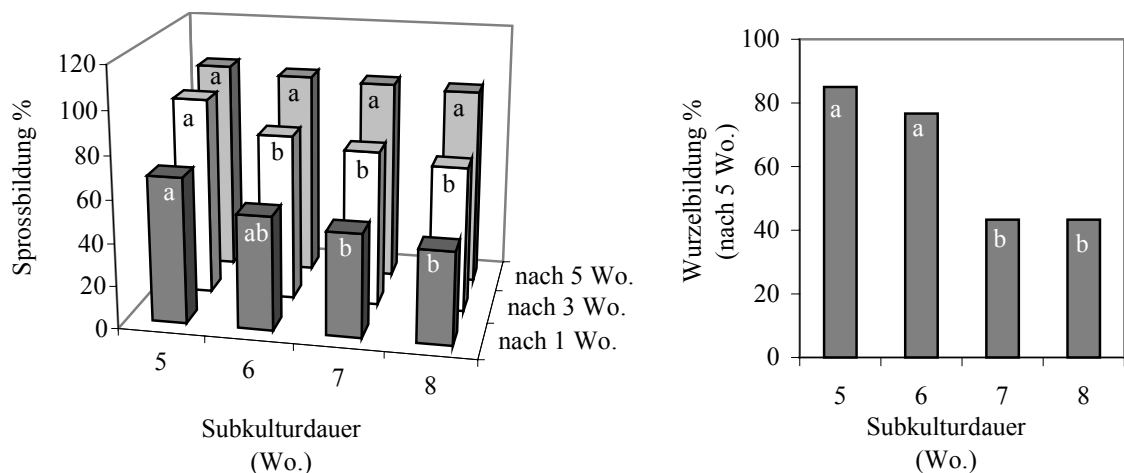


Abb. (6): Einfluss der Subkulturdauer auf die Spross- und Wurzelbildung der Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem hormonfreien MS-Medium

In der Wurzelbildung zeigte sich der Einfluss der Subkulturdauer nachhaltiger (Abb. 6). Nach 5 Wochen hatten ca. 80% der Nodiensegmente Wurzeln gebildet, wenn sie von 5 bzw. 6 Wochen alten Kulturen stammten, Nodiensegmente von 7 und 8 Wochen alten Kulturen waren dagegen nur zur 43% bewurzelt.

5.1.2 Einfluss der Position der Explantate am Spross

Dendranthema x grandiflorum 'PS 27'

Abbildung 7 zeigt, dass die ursprüngliche Position der Explantate am Spross die Konversion der nicht eingekapselten Nodiensegmente beeinflusste. Die Sprossbildung erfolgte bei den Sprossspitzen schneller und besser als bei den Nodiensegmenten. Nach einer Woche Kulturdauer hatten schon 91,7% der Sprossspitzen (1. Position) auf einem MS-Medium Sprosse gebildet, während die Nodiensegmente (2.-5. Position) zu diesem Zeitpunkt nur Sprossbildungsraten von ca. 30% erzielten. Nach 3 und 5 Wochen Kulturdauer gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Sprossbildung zwischen den Sprossspitzen und Nodiensegmenten mehr.

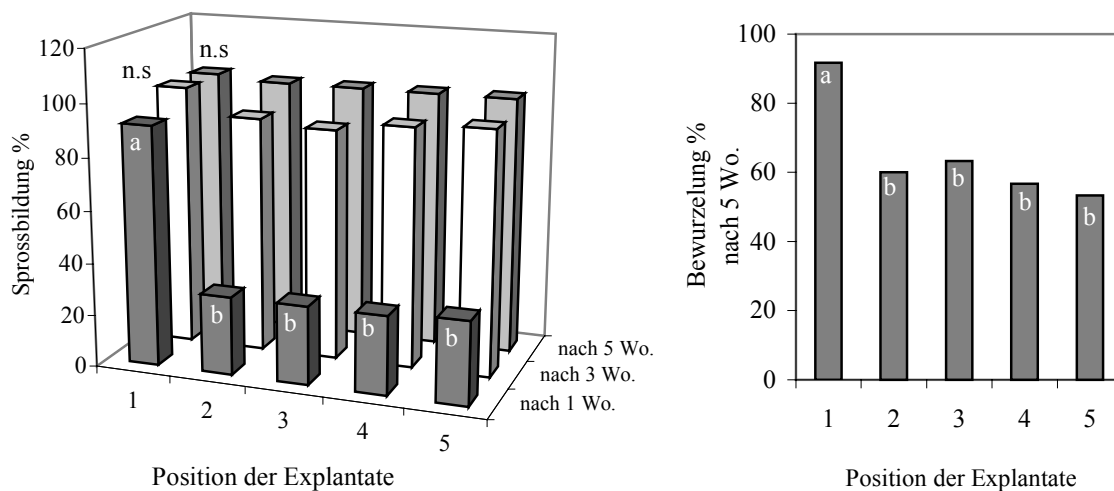


Abb. (7): Einfluss der ursprünglichen Position der Explantate am Spross auf die Spross- und Wurzelbildung der Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem hormonfreien MS-Medium (1 = Sprossspitze, 2 – 5 = Nodiensegmente in basaler Richtung).

Die Bewurzelung wurde durch den Entnahmeort der Explantate stärker beeinflusst als die Sprossbildung (Abb. 7). Die Sprossspitzen (1. Position) waren nach 5 Wochen Kulturdauer fast alle bewurzelt, während die Nodiensegmente maximal Bewurzelungsraten von 63% erzielten.

***Rosa hybrida* 'Kardinal'**

Um den Einfluss des Entnahmeortes bzw. der ursprünglichen Position der Explantate von *Rosa hybrida* 'Kardinal' am Spross auf die Konversion zu untersuchen, wurden von den Sprossen die apikalen, medialen oder basalen Sprossabschnitte getrennt zur Herstellung der künstlichen Samen verwendet.

Es zeigte sich, dass die ursprüngliche Position der verwendeten Explantate bei *Rosa* keinen Einfluss auf die Konversion hatte. Aus Tab. 21 ist zu entnehmen, dass unabhängig von den zugegeben Wachstumsregulatoren, es keine Rolle spielte, ob zur Einkapselung ausschließlich Segmente von der Sprossspitze, der Sprossmitte bzw. Sprossbasis verwendet wurden. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Spross- und Wurzelbildung zwischen den einzelnen Sprosssegmenten. Tendenziell waren die medialen Knospen etwas besser in der Sprossbildung und die apikalen Knospen in der Wurzelbildung.

Tab. (21): Einfluss der Position der Explantate am Spross auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal' nach 7 Wochen Kulturdauer auf einem Agar-Wasser-Medium.

Explantatlage	Sprossbildung %	Wurzelbildung %
apikal	32,0	32,0
medial	37,3	26,7
basal	34,7	22,7
Generelle Signifikanz	n.s	n.s

5.1.3 Konversion eingekapselter Nodiensegmente

Es sollte untersucht werden, ob eingekapselte Nodiensegmente von *Dendranthema* 'PS 27' zur Konversion angeregt werden können. Die eingekapselten Nodiensegmente wurden deshalb auf zwei verschiedenen Substraten kultiviert, denen in zwei Varianten Nährstoffe zugesetzt wurden.

Die eingekapselten Nodiensegmente müssen für die Konversion unbedingt mit Nährstoffen versorgt werden. Die Sprossbildung der Varianten, denen keine Nährstoffe zugesetzt wurden, betrug maximal 30% und Wurzeln wurden kaum gebildet (Abb. 8). Die Konversion auf den Substraten, die hormonfreies MS-Medium enthielten, erreichte mehr als 50%. Die eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' entwickelten sich sowohl auf Agar als auch auf Perlit als Konversionssubstrat. Die Sprossbildung auf Perlit war sogar besser als auf Agar. Wenn Nährstoffe zugesetzt worden waren, bildeten 93,3% der eingekapselten Nodiensegmente auf Perlit Sprosse, während auf Agar nur 66,7% der Kapseln Sprosse bildeten.

Für die weiteren Versuche wurde auf Agarmedien gearbeitet, da sie sich einfacher handhaben lassen.

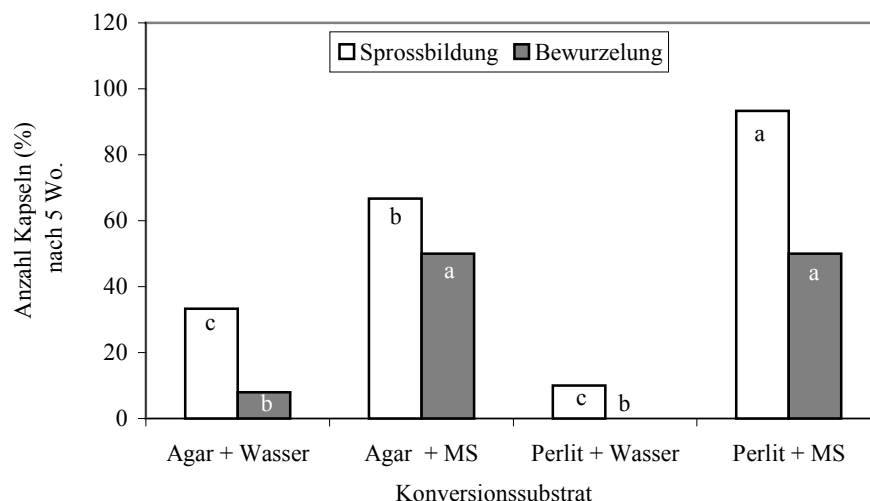


Abb. (8): Einfluss des Konversionssubstrates auf die Spross- und Wurzelbildung von eingekapselten Nodiensegmenten von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' bei Einsatz von 2% Na-Alginat mit destilliertem Wasser als Gelmatrix nach 5 Wochen Kulturdauer.

5.2 Entwicklung der Kapsel-Zusammensetzung für *Dendranthema*

5.2.1 Einfluss der Na-Alginatkonzentration

Die Festigkeit der Alginatkapsel beeinflusst zum Einen die Handhabbarkeit der Kugeln und zum Anderen die Konversion des eingekapselten Pflanzenmaterials. Unter diesen Gesichtspunkten sollte die Na-Alginatkonzentration optimiert werden. In diesem Versuch wurden die Ca-Alginat-Kapseln mit destilliertem Wasser hergestellt und zur Unterstützung der Sprossentwicklung dem Konversionssubstrat Nährstoffe und Wachstumsregulatoren zugesetzt.

Die Kapseln unterschieden sich in Form und Festigkeit in Abhängigkeit von den verwendeten Na-Alginatkonzentrationen. Wenn die Na-Alginatkonzentrationen 1,5% und 2,0% betrug, bildeten sich spitze und sehr weiche Kapseln. Nach einer Woche Kulturdauer war die Gelmatrix der Kapseln, die aus 1,5 bzw. 2,0% Na-Alginat gebildet wurden, zerflossen. Aus 2,5 bis 4,0% Na-Alginat bildeten sich kugelförmige und feste Kapseln.

Abbildung 9 zeigt, dass auch die Sprossbildung von der Festigkeit der Kapseln beeinflusst wurde. Die beste Sprossbildung erreichten nach 3 und 5 Wochen Kulturdauer Kapseln, die aus 3,0%-igem Na-Alginat hergestellt wurden. Höhere Na-Alginatkonzentrationen, die auch die Festigkeit der Kapseln erhöhten, hemmten die Sprossbildung.

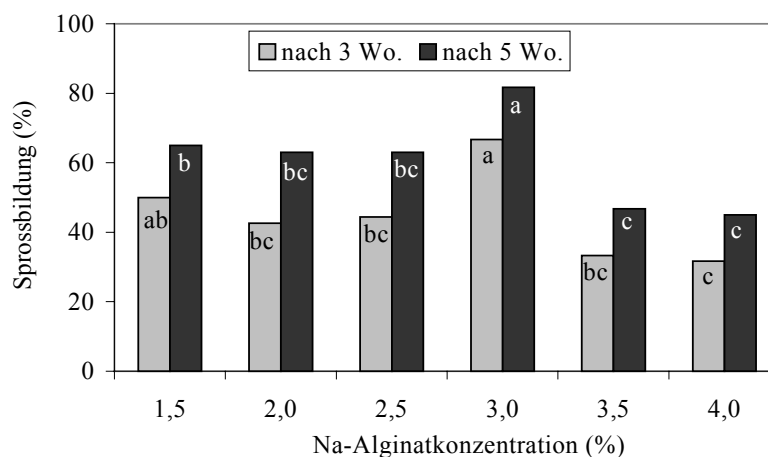


Abb. (9): Einfluss der Na-Alginatkonzentration auf die Sprossbildung von eingekapselten Nodiensegmenten von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' bei Einsatz von MS + 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBS als Konversionssubstrat.

Es wurde deshalb in den weiteren Versuchen mit einer Na-Alginatkonzentration von 3% zur Herstellung der Kapseln gearbeitet.

5.2.2 Einfluss der Nährstoffe

Nährstoffzugabe zur Kapsel

Es sollte nun untersucht werden, ob die notwendigen Nährstoffe ausschließlich über die Kapsel verabreicht werden können.

Abbildung 10 zeigt, dass eine maximale Sprossbildungsrate von 84,7% nach 5 Wochen erzielt werden konnte, wenn nur der Gelmatrix MS-Salze, Vitamine und Zucker zugesetzt wurden. Der Zusatz von MS-Salzen zur Gelmatrix hatte einen stärker fördernden Einfluss auf die Sprossbildung als der Zusatz des Zuckers. Auch ohne Zuckerzugabe konnte durch die Zugabe der halben oder vollen Konzentration der MS-Salze die Sprossbildung von 21 auf 58% erhöht, also mehr als verdoppelt, werden. Der Zusatz von Zucker führte zu einer weiteren Steigerung der Sprossbildung um nochmals fast 30% auf 84%. Das setzte jedoch voraus, dass die Kapsel auch die volle Konzentration der MS-Salze enthielt.

Die Wurzelbildungsrate war in allen Varianten sehr niedrig (Abb. 10).

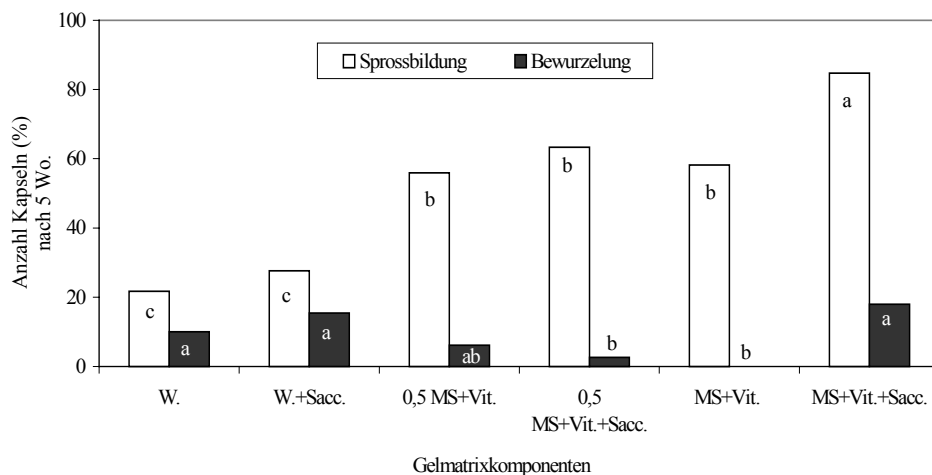


Abb. (10): Einfluss der Gelmatrixkomponenten (MS-Salze und Zucker) auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium nach 5 Wochen Kulturdauer.

Die eingekapselten Nodiensegmente bildeten zwar Sprosse und Wurzeln, konnten sich jedoch auf dem Agar-Wasser-Medium nicht weiterentwickeln. Die eingekapselten Nodiensegmente mit Konversion hatten nur sehr kurze Sprosse gebildet, obwohl die Kapseln Nährstoffe enthielten.

Es musste also weiter an der kontinuierlichen Nährstoffversorgung der Nodiensegmente gearbeitet werden.

Methoden der Einkapselung

Es wurde vermutet, dass schon beim Herstellen der Kapseln, durch den Härungs- und Waschvorgang die zugesetzten Nährstoffe wieder entzogen wurden. Deshalb waren verschiedene Methoden der Kapselherstellung miteinander verglichen worden.

Aus Abbildung 11 geht hervor, dass der Zusatz von MS-Medium zur Gelmatrix und zur Härterlösung die Sprossbildung im Vergleich zur Kontrolle (mit wässriger Härterlösung und einer Wäsche mit Wasser) beschleunigte. Der Zusatz des vollen MS-Mediums zur Gelmatrix und zur Härterlösung brachte schon nach 3 Wochen Kulturdauer eine signifikante Zunahme in der Sprossbildung im Vergleich zu den anderen Varianten. Nach 5 Wochen Kulturdauer hatten alle Varianten zu ca. 100% Sprosse gebildet und waren signifikant besser als die Kontrolle (wässrige Härterlösung und Wäsche mit Wasser). Alle eingekapselten Nodiensegmente, die Sprosse gebildet hatten, wuchsen auf dem Agar + Wasser-Medium zu Sprossen von ca. 15 mm Länge heran. Die Kontrollvariante hatte wieder sehr kurze Sprosse gebildet.

In allen Varianten bildeten nur wenige Nodiensegmente Wurzeln (2,1-23%). Die maximale Bewurzelung (ca. 23%) wurde bei Zusatz des vollen MS-Mediums zur Gelmatrix und zur Härterlösung oder bei Zusatz von Wasser zur Gelmatrix und Ca-freiem MS zur Härterlösung erlangt.

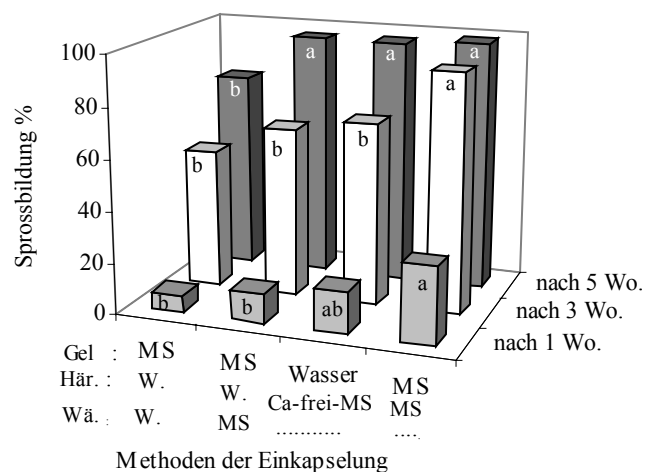


Abb. (11): Einfluss der Methoden der Einkapselung auf die Sprossbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium.

Im Folgenden wurden die verbesserte Methodik zur Einkapselung angewendet.

Nährstoffverluste

Es wurde vermutet, dass die Nährstoffe ins Konversionssubstrat ausdiffundieren, insbesondere wenn das Konversionssubstrat keine Nährstoffe enthielt. Deshalb sollten beispielhaft die NO_3^- -Verluste gemessen werden, wenn die Kugeln auf einem Agar-Wasser-Medium aufgesetzt werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass nach 24 Stunden Inkubationsdauer ca. 93% NO_3^- ins Konversionssubstrat ausdiffundiert waren. Ab dem 5. Tag diffundieren keine Nährstoffe weiter ins Konversionssubstrat. Nach 6 Tagen Inkubationsdauer waren nur noch 4% NO_3^- in den Kugeln (Tab.22).

Tab. (22): Einfluss der Inkubationsdauer der Kugeln auf einem Agar-Wasser-Medium auf die NO_3^- -Verluste.

Inkubationsdauer (Tage)	Verlust NO_3^- %
0	00,00 b
1	92,85 a
2	94,74 a
3	94,54 a
4	95,28 a
5	95,67 a
6	95,68 a
Generelle Signifikanz	0,000

5.2.3 Einfluss von Wachstumsregulatoren

Da die Wurzelbildung noch keine akzeptablen Werte erreicht hatte, wurde die Wirkung verschiedener Konzentrationen von Indol-3-essigsäure (IES) untersucht.

In diesem Versuch war auch zum Vergleich eine Variante mit Sprosssegmenten, die nicht eingekapselt waren, eingesetzt worden. Abbildung 12 zeigt, dass in dieser Variante (Nodiensegmente ohne Einkapselung auf einem MS-Medium) nach einer Woche Kulturdauer schon 70% der Nodiensegmente Sprosse gebildet hatten, während die eingekapselten Nodiensegmente erst zu 20% Sprosse entwickelten. Nach 3 Wochen Kulturdauer hatte sich dieser Unterschied jedoch in den meisten Varianten ausgeglichen. Nur der Zusatz von 0,5 bzw. 1,0 mg/l Indol-3-essigsäure (IES) zur Gelmatrix, zur Härterlösung und zur Wäsche hemmte die Sprossentwicklung. Nach 3 Wochen Kulturdauer hatten sich in diesen Varianten signifikant weniger Sprosse gebildet. Nach 5 und 8 Wochen Kulturdauer hatten jedoch alle Varianten zu fast 100% Sprosse mit einer Länge von ca. 15 mm gebildet.

Abbildung 12 zeigt, dass die maximale Bewurzelung (100%) bei 1,0 mg/l IES in der Gelmatrix, der Härterlösung und der Wäsche auf einem Konversionssubstrat aus Agar und Wasser erlangt wurde. Diese Variante hatte nach 3, 5 und 8 Wochen Kulturdauer im Vergleich zu den anderen Varianten eine signifikant bessere Bewurzelung. Nur die Variante mit den Nodiensegmenten ohne Einkapselung auf einem MS-Medium war nach 8 Wochen ebenso gut bewurzelt. Die geringste Bewurzelungsrate wurde bei Zusatz von 0,2 mg/l BAP erlangt.

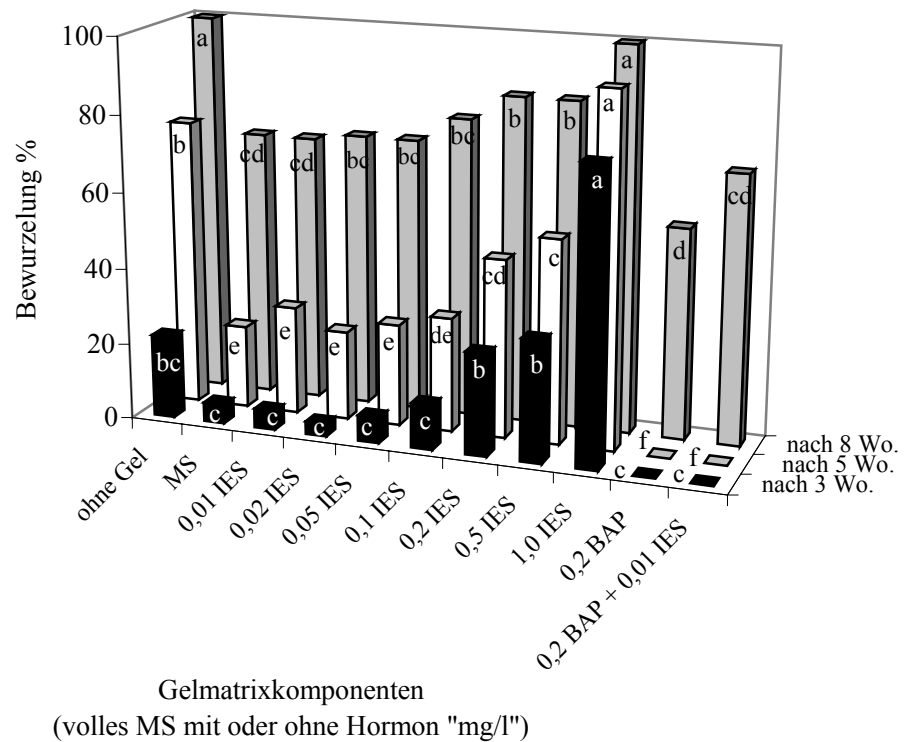
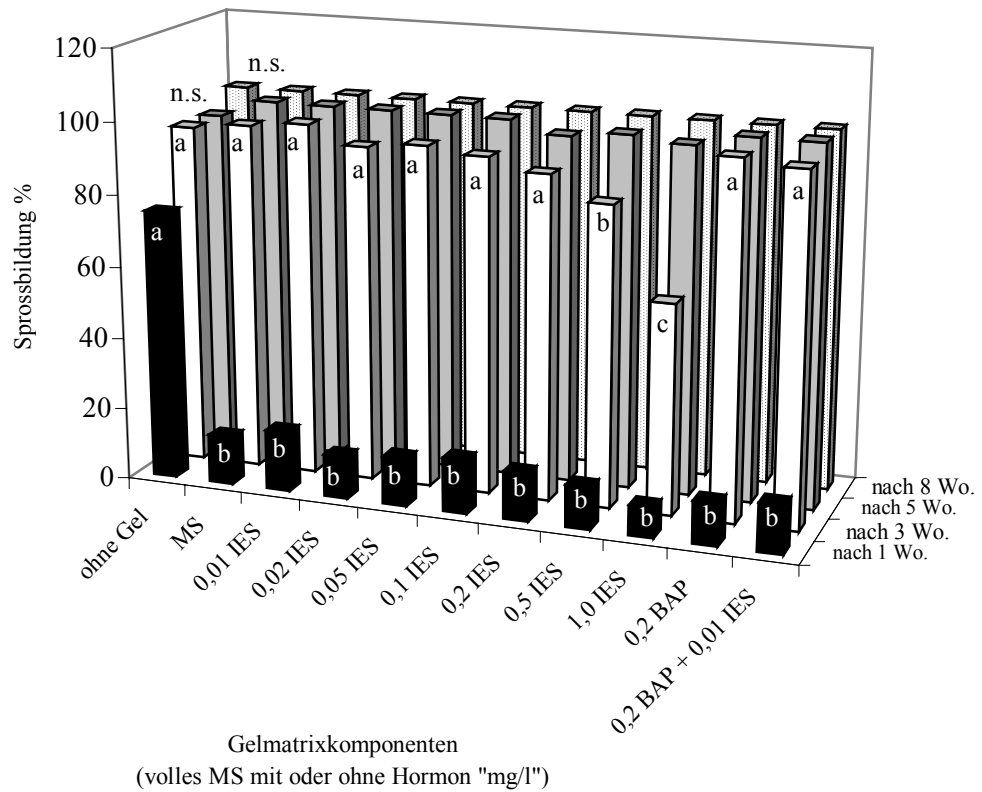


Abb. (12): Einfluss von Auxin und Cytokinin auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' bei Einsatz von Agar mit destilliertem Wasser als Konversionssubstrat.

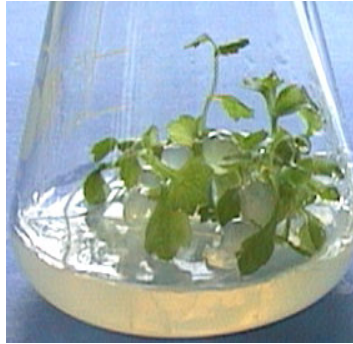


Abb. (13): Wachstum und Entwicklung der k. S. von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium bei Zusatz von MS + 1,0 mg/l IES zur Gelmatrix und zur Härterlösung und die Wäsche mit den gleichen Komponenten.

5.2.4 Übertragung der Ergebnisse auf weitere *Dendranthema*-Sorten

Es sollte nun untersucht werden, ob die für *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' entwickelte Einkapselungsmethode auf andere Chrysanthemen-Sorten übertragen werden kann. Dazu wurden zunächst Versuche mit drei weiteren *Dendranthema*-Sorten 'Snowdon Weiß', 'Topfweiß' und 'Garden mum' durchgeführt. Ergänzend wurde die Wirkung von Gibberellinsäure (GA₃) bzw. Cytokinin (BAP) in der Gelmatrix auf die Konversion dieser Sorten untersucht.

Alle untersuchten Zusammensetzungen der Gelmatrix ermöglichten nach 8 Wochen eine 100%ige Sprossbildung der Sorten (Abb. 14). Die schnellste Sprossbildung war bei der Zugabe von 1 mg/l IES zur Gelmatrix zu verzeichnen. Der Zusatz von GA₃ und BAP verzögerte die Sprossbildung. Besonders die Wurzelbildung wurde durch diese Wachstumsregulatoren (GA₃ und BAP) gehemmt. Diese Ergebnisse zeigten, dass die für 'PS 27' entwickelte Gelmatrixzusammensetzung auf andere Sorten erfolgreich übertragen werden kann.

In einem weiteren Versuch wurden deshalb die Konversion von 10 weiteren *Dendranthema*-Sorten ('Snowdon Weiß', 'Bronze', 'Minstrel', 'Miral', 'Trumpf', 'Taube', 'Branglow', 'Branbeach', 'Evelyn' und 'Majola') geprüft. Trotz sortenabhängiger Unterschiede erfolgte die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente auf einem Agar-Wasser-Substrat zu 100%, wenn die Gelmatrix MS-Medium mit 1,0 mg/l IES enthielt.

Damit kann tatsächlich von einer optimalen Zusammensetzung der Gelmatrix für die Konversion eingekapselter *Dendranthema*-Nodiensegmente gesprochen werden.

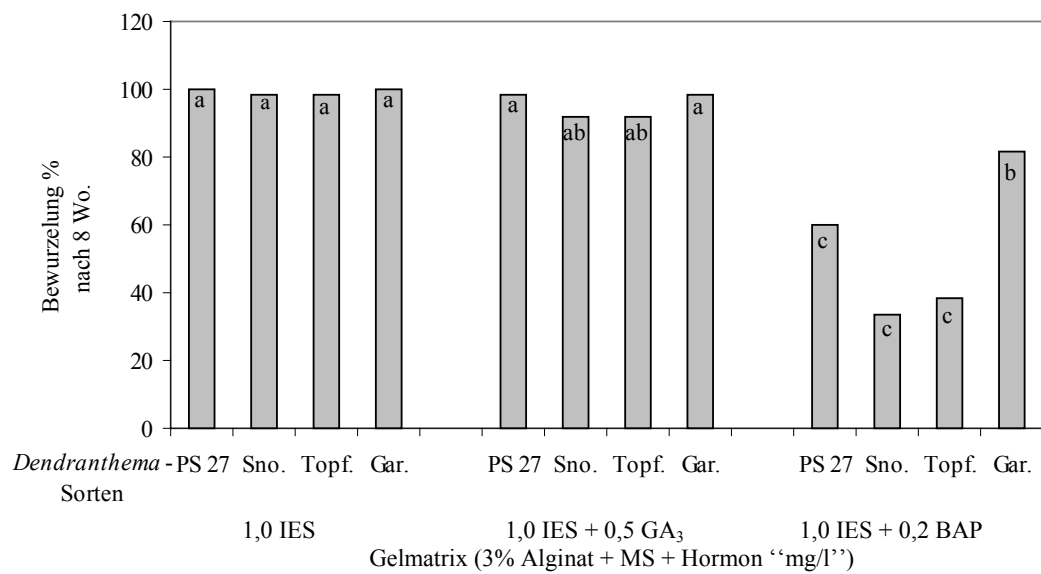
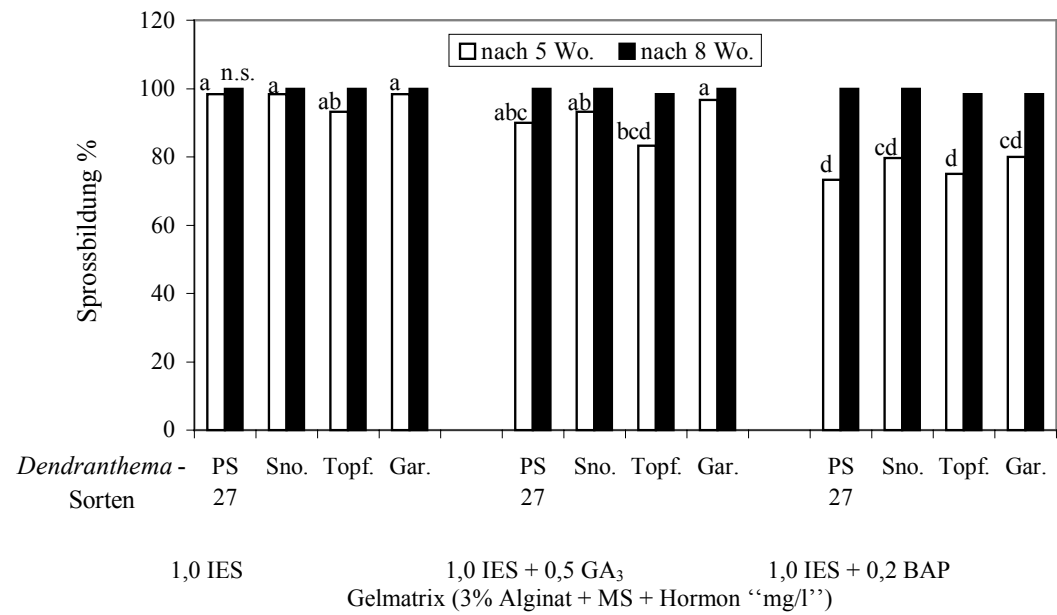


Abb. (14): Einfluss der Gelmatrixkomponenten auf die Konversion der künstlichen Samen von *Dendranthema*-Sorten bei Einsatz von Agar mit destilliertem Wasser als Konversionssubstrat.

5.3 Entwicklung der Kapselzusammensetzung für Rosa

Für die Rosen, die vermutlich andere Ansprüche an die Nährstoffversorgung und die Zugabe von Wachstumsregulatoren haben als die Chrysanthemen, musste die Zusammensetzung der Gelmatrix angepasst werden. Da über die Reaktion der Rosen nichts bekannt war, wurde zunächst der Einfluss verschiedener Wachstumsregulatoren untersucht.

5.3.1 Einfluss der Wachstumsregulatoren

Die Sprossbildung sollte durch Cytokinin (BAP) und Gibberellin (GA₃) gefördert werden, sowie die Wurzelbildung durch Auxin (IBS). Die Konzentrationen und Kombinationen wurden ausgehend vom Verhältnis der Wachstumsregulatoren in der Vermehrungskultur (0,25 mg/l BAP + 0,5 mg/l GA₃) frei gewählt.

Das Resultat dieses Experimentes war eine gute Sprossbildung. Die Wurzelentwicklung war jedoch gering. Abbildung 15 zeigt, dass die Sprossbildung zwischen 43,3% und 76,7% lag. Unter dem Einfluss von Cytokinin, in Verbindung mit Gibberellin oder Auxin, konnte eine Sprossbildung zwischen 61,1 - 76,7% erreicht werden.

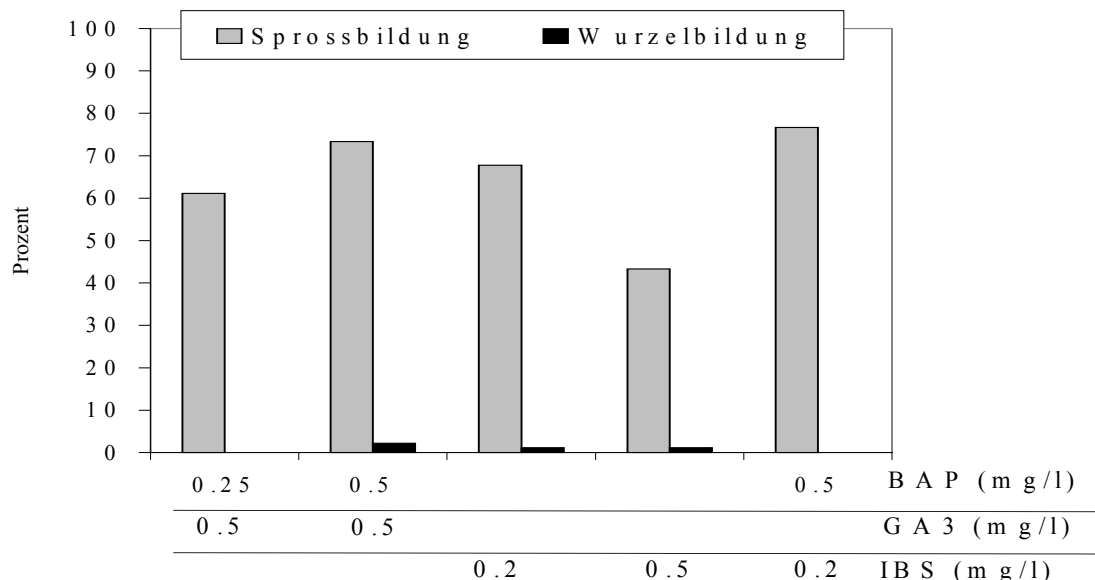


Abb. (15): Spross- und Wurzelbildung bei *Rosa hybrida* 'Kardinal', beeinflusst durch die Zugabe verschiedener Wachstumsregulatoren.

Im letzten Experiment war die Bewurzelung minimal. Daher wurden der Gelmatrix in diesem Experiment höhere Auxinkonzentrationen zugegeben, um die Wurzelbildung zu initiieren. Als Auxine wurden IBS und NES einzeln oder in Kombination verwendet (Abb. 16).

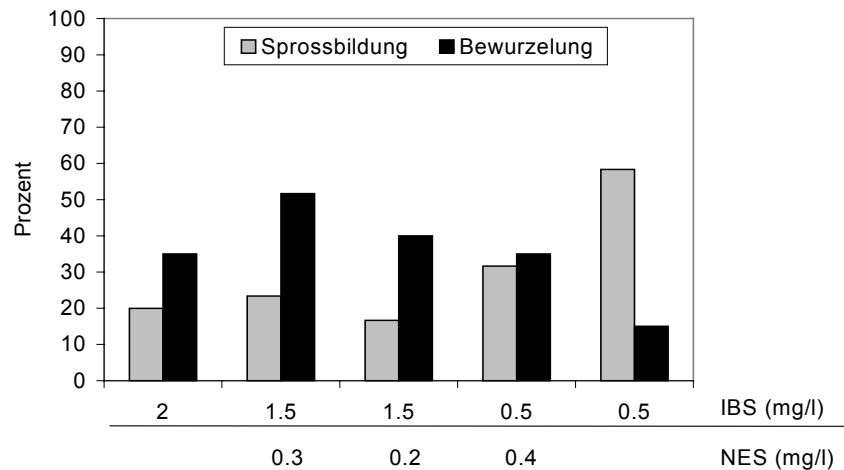


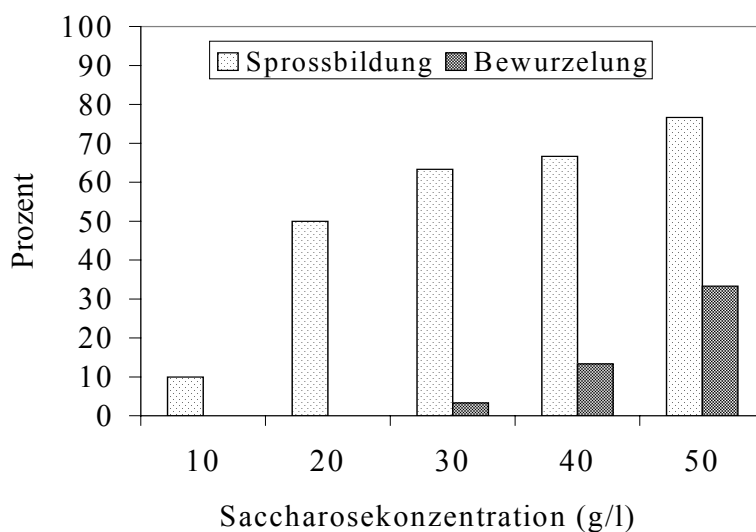
Abb. (16): Spross- und Wurzelbildung eingekapselter Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal' unter Einfluss von IBS und NES bei Einsatz von Agar mit destilliertem Wasser als Konversionssubstrat.

Die Wurzelbildung erreichte in diesem Experiment maximal 51,7% in einer Variante, in der IBS und NES gemeinsam appliziert wurden. Insgesamt erzielten die Auxinkombinationen nicht den gewünschten Effekt auf die Wurzelbildung. Es deutet sich jedoch an, dass NES die Bewurzelung fördert. In diesem Experiment konnte aber erstmals eine Annäherung zwischen Spross- und Wurzelbildung erreicht werden. Bei der Zugabe von 0,5 mg/l IBS + 0,4 mg/l NES zur Gelmatrix betrug die Wurzelbildungsrate 35% und die Sprossbildungsrate 31,7%, somit lag die Konversion bei ca. 32% (Abb. 16).

5.3.2 Einfluss der Saccharosekonzentration

Die letzten Ergebnisse zeigten, dass die Konversion der k. S. von *Rosa hybrida* 'Kardinal' zu gering (ca. 30%) war und alle sich entwickelnden Nodiensegmente nur sehr kurze Sprosse gebildet hatten. Der Gelmatrix wurden deshalb verschiedene Zuckermengen zugegeben. Um die Abhängigkeit der Konversion von *Rosa hybrida* 'Kardinal' von der Zuckerkonzentration zu untersuchen, wurde die Saccachrosekonzentration in der Gelmatrix von 10 g/l auf 90 g/l erhöht.

a)



b)

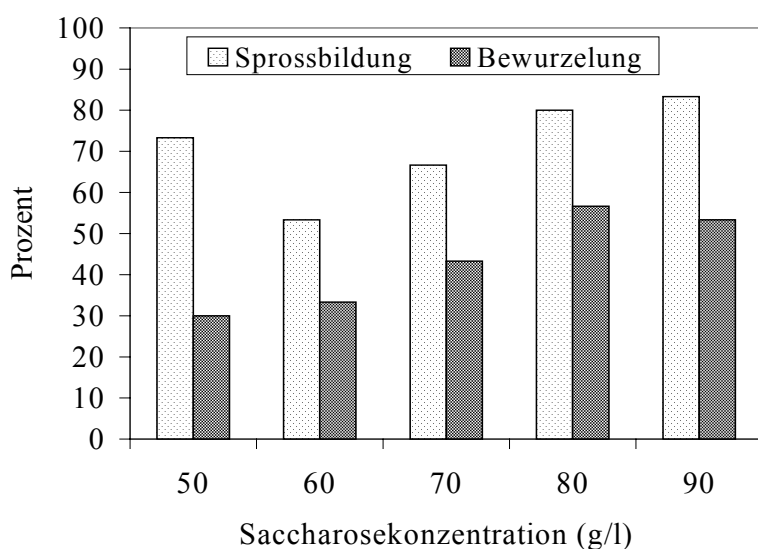


Abb. (17): Einfluss der Saccharosekonzentrationen mit MS + 1 mg/l IBS als Gelmatrix auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal' bei Einsatz von Agar + Wasser als Konversionssubstrat.

Die Wurzel- und Sprossentwicklung wurde mit steigender Saccharosekonzentration gefördert (Abb. 17). Bei niedrigen Zuckerkonzentrationen war die Sprossbildung besser als die Wurzelbildung. Die ursprünglich verwendete Konzentration von 30 g/l Saccharose ermöglichte eine Sprossbildungsrate von über 50%, die Wurzelbildung war aber nur bei 3,3% der eingekapselten Nodiensegmente möglich. Höhere Zuckerkonzentrationen, wie 40 g/l und 50 g/l führten zu einer wesentlich besseren Spross- und insbesondere Wurzelentwicklung

(Abb. 17a). Eine weitere Steigerung der Saccharosekonzentration von 50 g/l Saccharose auf 90 g/l verbesserte Spross- und Wurzelbildung weiter (Abb. 17b). Die Sprossbildung erreichte bei einer Zuckerkonzentration von 80 g/l und 90 g/l über 80% und die Wurzelbildung stieg auf über 50%. Das sind die bisher höchsten Werte, die für die Spross- und Wurzelbildung für *Rosa* erzielt wurden. Die Konversion erreichte fast 60%. Abb. 18 vermittelt einen Eindruck von der Entwicklung der Pflanzen.



Abb. (18): Konversion der künstlichen Samen von *Rosa hybrida* 'Kardinal' auf einem Agar-Wasser-Medium bei Einsatz von 3% Alginat + MS + 90 g/l Saccharose + 1 mg/l IBS als Gelmatrix nach 7 Wochen Kulturdauer.

5.3.3 Einfluss der Kapselgröße

Da die Nährstoffversorgung die Konversion der eingekapselten Rosensegmente stark beeinflusste, sollte untersucht werden, ob durch die Vergrößerung des Volumens der Gelmatrix ein positiver Effekt erzielt werden kann.

Durch die Nutzung der Mikropipette war eine schnelle und exakte Arbeitsweise möglich. Die Größe der künstlichen Samen konnte genormt und somit gewährleistet werden, dass jeder Samen das gleiche Volumen besaß und die gleiche Menge an Nährstoffen zur Verfügung stand. Zu berücksichtigen wäre allerdings, dass das Volumen der Mikropipette bei der genauen Dosierung geringfügig variierte. Beim Nachwiegen von 50 künstlichen Samen ohne Pflanzenmaterial mit einem Volumen von 0,085 ml betrug das durchschnittliche Gewicht eines Samens 0,117 g.

Abbildung 19 zeigt, dass sowohl 0,075 ml als auch 0,085 ml pro Kapsel ausreichen, um Spross- und Wurzelbildung zu initiieren. Das Verhältnis zwischen Spross- und Wurzelbildung war aber bei 0,085 ml Volumen leicht besser. Daher wurden weitere Experimente unter Verwendung von 0,085 ml Volumen durchgeführt.

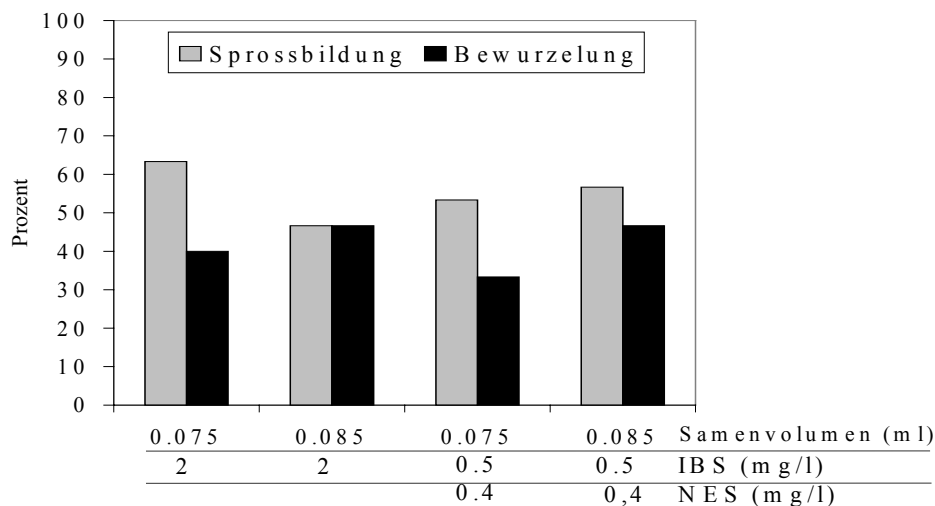


Abb. (19): Einfluss der Kapselgröße auf die Spross- und Wurzelbildung von Rose 'Kardinal'.

5.3.4 Verbesserung der Konversion der künstlichen Samen von *Rosa*

Bisher wurden die Rosen wie die Chrysanthemen auch nach 5 Wochen Subkultur für die Einkapselung verwendet. Da es sich aber gezeigt hatte, dass die Rosen nicht so gut wuchsen, wurden in diesem Experiment Nodiensegmente nach 3 Wochen Kulturdauer entnommen, denn zu diesem Zeitpunkt waren die Stängel noch sehr weich und wuchsfreudig.

Auf der Basis der bisherigen Resultate betrug das Kapselvolumen 0,085 ml und der Gelmatrix wurden 80 g/l bzw. 90 g/l Saccharose mit 2 mg/l IBS bzw. 0,5 mg/l IBS + 0,4 mg/l NES zugesetzt.

Mit diesem Experiment konnte die Konversion von vollständigen Pflanzen bei fast 60% der eingekapselten Nodiensegmente erzielt werden. Interessanterweise war hier die Bewurzelung besser als die Sprossbildung. Die Bewurzelung konnte bei 75-90% der eingekapselten Nodiensegmente und die Sprossbildung zu nur durchschnittlich 50% angeregt werden. Die Unterschiede zwischen 80 g/l und 90 g/l Saccharose waren gering (Abb. 20).

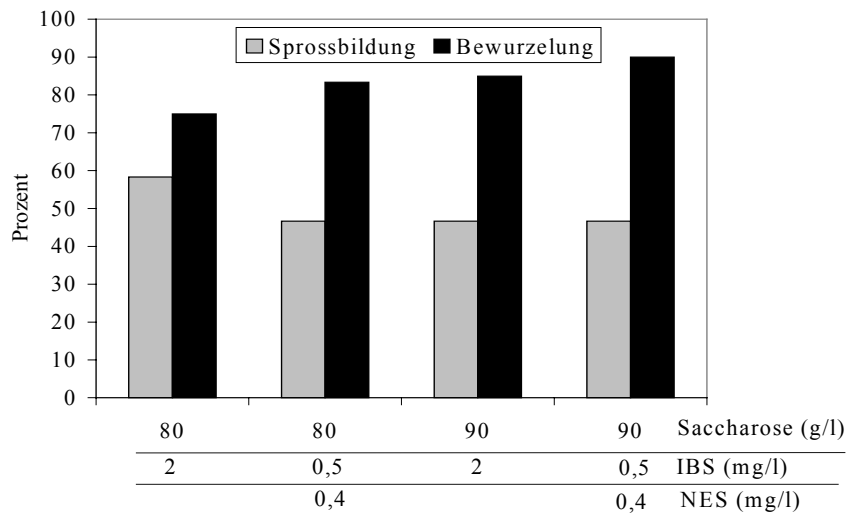


Abb. (20): Spross- und Wurzelbildung der k. S. von Rose 'Kardinal' auf einem Agar-Wasser-Medium bei Verwendung von 3 Wochen altem Pflanzenmaterial nach 7 Wochen Kulturdauer.

Da die Konversion nach 7 Wochen schon fast 60% erreicht hatte (Abb. 20), sollte getestet werden, ob das Aufgießen mit MS die Pflanzenbildung weiter verbessern kann.

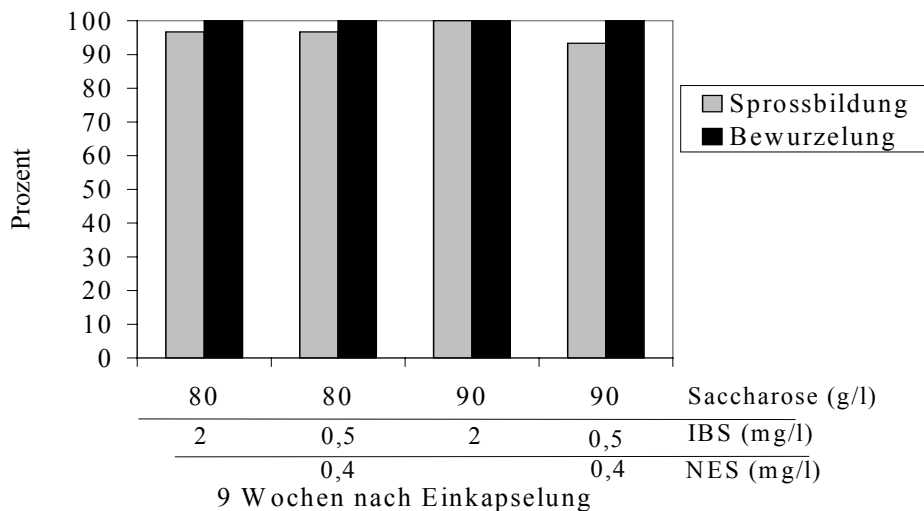


Abb. (21): Einfluss der Gelmatrixkomponenten beim Aufgießen von MS-Medium auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal' auf einem Agar-Wasser-Medium nach 9 Wochen Kulturdauer.

Durch das Aufgießen mit 5 ml MS-Medium nach 7 Wochen Wachstum wurden den Samen erneut Nährstoffe zugeführt. Aus Abbildung 21 erkennt man, dass zwei Wochen nach dem Aufgießen mit MS-Medium 80 – 100% der eingekapselten Nodiensegmente Spross und Wurzeln gebildet hatten. Die Wurzelbildung wurde sehr gut gefördert, sie stieg von

ursprünglichen 70 – 80% bei allen Varianten auf 100% an. Die Sprossbildung erfuhr ebenfalls eine Steigerung von ca. 50%, von ehemals ca. 40% konnte man nun eine Sprossbildung von über 90% verzeichnen. Bei der Zugabe von 90 g/l Saccharose und 2 mg/l IBS erreichte man erstmals in dieser Arbeit eine 100% ige Konversion und die Pflanzen zeigten einen Zuwachs auf eine Sprosslänge von ca. 5 cm (Abb. 22).



Abb. (22): Entwicklung der Pflanzen aus künstlichen Samen von *Rosa hybrida* 'Kardinal' unter dem Einfluss von 2 mg/l IBS und 90 g/l Saccharose mit Aufgießen von MS-Medium nach 7 Wochen Wachstum nach 9 Wochen Kulturdauer.

5.4 Einfluss des Substrates auf die Konversion unter sterilen Bedingungen

Nach der Veränderung der Einkapselungsmethode zur Herstellung der künstlichen Samen (Härterlösung und Wäsche) und Entwicklung der optimalen Gelmatrixzusammensetzung erreichte die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium 100%. Da für die Untersuchungen unter unsterilen Bedingungen nicht mit einem Agar-Medium gearbeitet werden kann, sollte zunächst unter sterilen Bedingungen untersucht werden, welches Substrat mit destilliertem Wasser geeignet ist für die Konversion der künstlichen Samen von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'.

Vier anorganische Substrate wurden mit dem Agarmedium verglichen. Die künstlichen Samen von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' konnten sich auf allen angewendeten Substraten entwickeln (Abb. 23 und 24).

Die künstlichen Samen von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' entwickelten sich auf den anorganischen Substraten schneller als auf dem Agar-Wasser-Medium. Dabei war die Entwicklung auf dem Perlit-Wasser-Substrat am schnellsten. Die Unterschiede waren aber nach 5 Wochen ausgeglichen und nach 8 Wochen Kulturdauer war die Sprossbildung 100% auf allen untersuchten Substraten (Abb. 24). Die Bewurzelung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' war auf den anorganischen Substraten tendenziell besser als auf Agar. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Abbildung 23 gibt einen Eindruck von der Sprossentwicklung auf den verschiedenen Substraten. Die Sprosse auf den inerten Medien wirkten kräftiger und hatten größere Blätter als die Sprosse auf Agar.

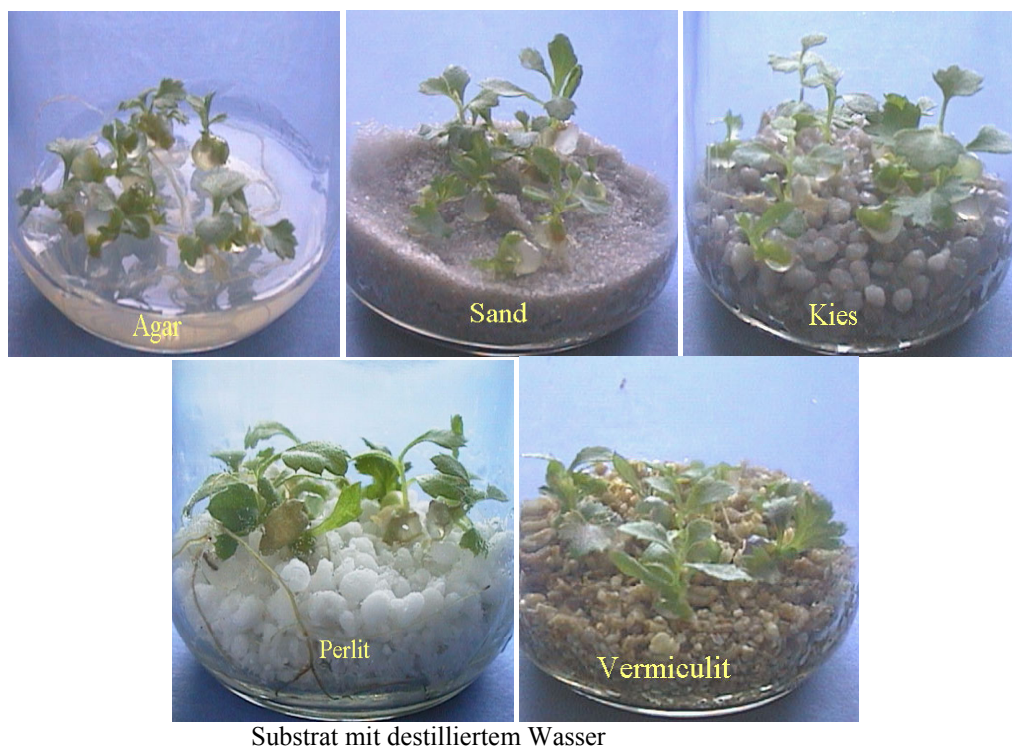


Abb. (23): Wachstum und Entwicklung der künstlichen Samen von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf verschiedenen Substraten unter sterilen Bedingungen.

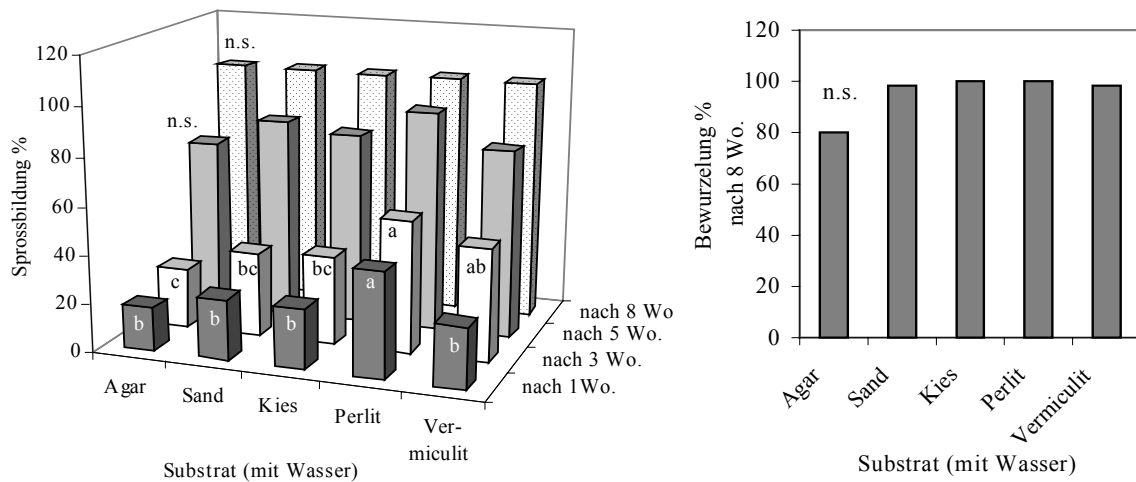


Abb. (24): Einfluss des Substrates auf die Spross- und Wurzelbildung der künstlichen Samen von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' bei Einsatz von MS + 1,0 mg/l IES als Gelmatrix.

Nachfolgend wurde die Konversion verschiedener *Dendranthema*-Sorten auf Sand geprüft. Abbildung 25 zeigt, dass die Konversion der künstlichen Samen der verschiedenen *Dendranthema*-Sorten auf einem Sand-Wasser-Substrat unter sterilen Bedingungen in gleicher Weise zu 100% erfolgte. Auch traten keine Unterschiede zwischen den Sorten auf.

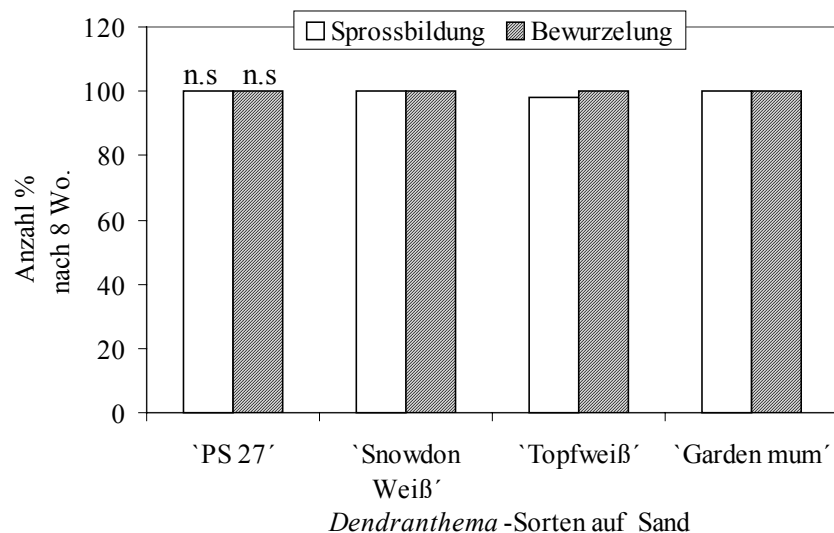


Abb. (25): Konversion der künstlichen Samen von *Dendranthema*-Sorten auf Sand mit destilliertem Wasser als Konversionssubstrat unter sterilen Bedingungen.

Gleiches zeigte sich bei der Konversion der anderen 10 *Dendranthema*-Sorten. Abb. 26 zeigt beispielhaft die Entwicklung dieser Sorten auf dem Sand-Substrat. Die Sortenunterschiede zeigten sich im Wuchs, aber nicht in der Konversion.



Abb. (26): Konversion von *Dendranthema*-Sorten auf einem Sand-Wasser-Substrat unter sterilen Bedingungen.

5.5 Entwicklung einer Samenschale für unsterile Bedingungen

Für die Aussaat der eingekapselten Nodiensegmente unter unsterilen Bedingungen ist die Entwicklung einer „Samenschale“ erforderlich. Es sollte deshalb zunächst unter sterilen Bedingungen die Wirkung einer zweiten Kapselschicht untersucht werden. Als Konversionssubstrat wurde Agar mit destilliertem Wasser verwendet.

Die Verwendung einer zweiten Schicht als Samenschale hatte keinen negativen Einfluss auf die Konversion der k. S. von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' (Abb. 27). Die Konversion der k. S. erreichte nach 8 Wochen Kulturdauer 100% bei allen Varianten. Die Entwicklung der Pflanzen war bei Zusatz von MS-Salzen mit oder ohne anderen Komponenten zur zweiten Schicht aber besser (Abb. 28).

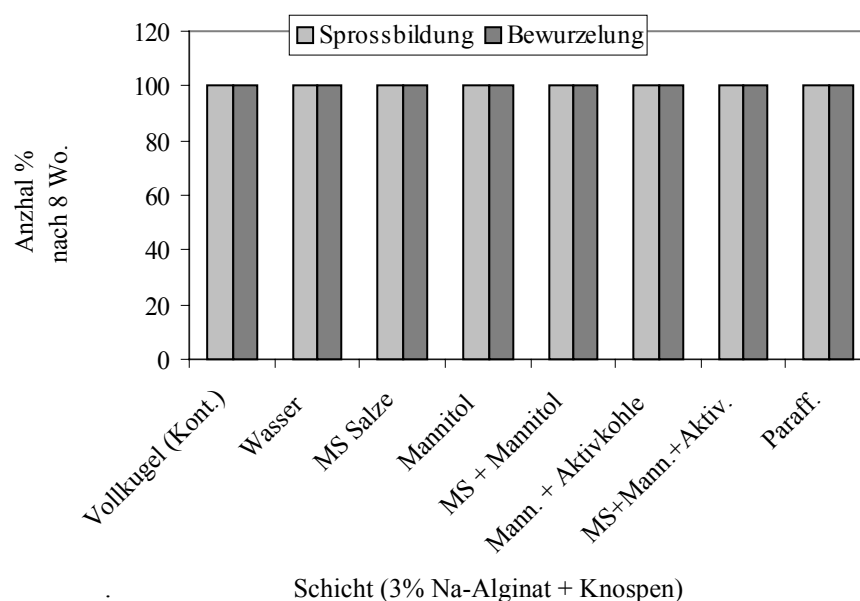


Abb. (27): Einfluss einer zweiten Kapselschicht auf die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' bei Einsatz von Agar mit destilliertem Wasser als Konversionssubstrat nach 8 Wochen Kulturdauer.



Abb. (28): Wachstum und Entwicklung der k. S. von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium bei Einsatz einer Zwei-Schicht-Samenschale.

Da die Verwendung einer zweiten Schicht als Samenschale keinen negativen Einfluss auf die Konversion der k. S. von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium unter sterilen Bedingungen hatte, sollte nun die Konversion der k. S. von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Perlit-Wasser-Substrat unter unsterilen Bedingungen untersucht werden.

Unter unsterilen Bedingungen kam es zur Kontamination der Kapseln (Abb. 29). Bei der Ein-Schicht-Kapsel (Kontrolle) waren fast 50% kontaminiert. Wenn die äußere Schicht der Zwei-Schicht-Kapseln MS-Salze enthielt, erreichte die Kontamination in einigen Varianten sogar noch höhere Werte. Der Zusatz von MS Salzen + 0,2 M Mannitol + 0,5 g/l Aktivkohle zur zweiten Schicht brachte die maximale Kontaminationsrate von (78,3%), gefolgt von MS Salzen + 0,2 M Mannitol (68,3%) und MS-Salzen (46,7%). Andererseits war der Anteil kontaminierter Kapseln sehr niedrig, wenn die zweite Schicht keine MS-Salze enthielt. Der niedrigste Anteil kontaminierter Kapseln (6,7%) wurde bei Verwendung einer Zwei-Schicht-Kapsel mit Zusatz von Wasser zur zweiten Schicht gefunden, gefolgt von der Variante mit Paraffin-Behandlung (20%).

Von den eingekapselten Nodiensegmenten starben 2 bis 30% unter unsterilen Bedingungen ab (Abb. 29). Die Behandlung der künstlichen Samen mit sterilisiertem Paraffin für 20 Sec. vor der Keimung brachte nach 8 Wochen Kulturdauer den maximalen Verlust (30%) unter unsterilen Bedingungen. Bei der Verwendung der Zwei-Schicht-Kapsel mit Zusatz von Wasser zur zweiten Schicht führte dagegen nur bei 6,7% der eingekapselten Nodiensegmente zum Absterben und damit lag die Anzahl abgestorbener Nodiensegmente niedriger als in der Kontrolle (Ein-Schicht-Kapsel) mit 16,6%. Die geringe Anzahl abgestorbener Knospen bei Zwei-Schicht-Kapseln mit MS Salzen + Mannitol und MS Salze + Mannitol + Aktivkohle,

müssen im Zusammenhang mit den extrem hohen Ausfällen in diesen Varianten durch Kontaminationen gesehen werden.

Einige Nodiensegmente starben zwar nicht ab, zeigten aber auch keine Entwicklung. Das konnte bis zu 10% der Nodiensegmente betreffen. Die Varianten, deren zweite Schicht nur Wasser oder Mannitol enthielten, hatten geringere Anteile sich nicht entwickelnder Nodiensegmente. Wenn die zweite Schicht MS-Salze + 0,2 M Mannitol + 0,5 g/l Aktivkohle enthielt, waren nach 8 Wochen Kulturdauer alle noch lebenden Nodiensegmente konvertiert. Bei der Kontrolle zeigten 16,7% und bei Paraffin-Behandlung 18,3% der Nodiensegmente keine Reaktion (Abb. 29).

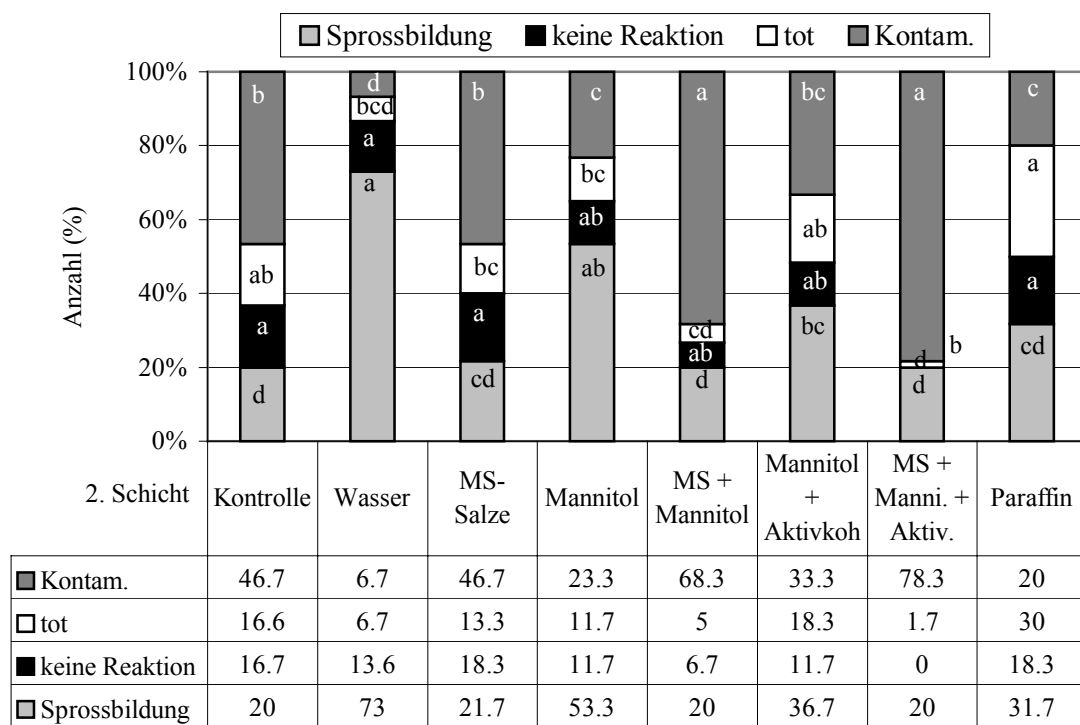


Abb. (29): Einfluss der zweiten Kapselschicht auf die Kontamination und Entwicklung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' unter unsterilen Bedingungen.

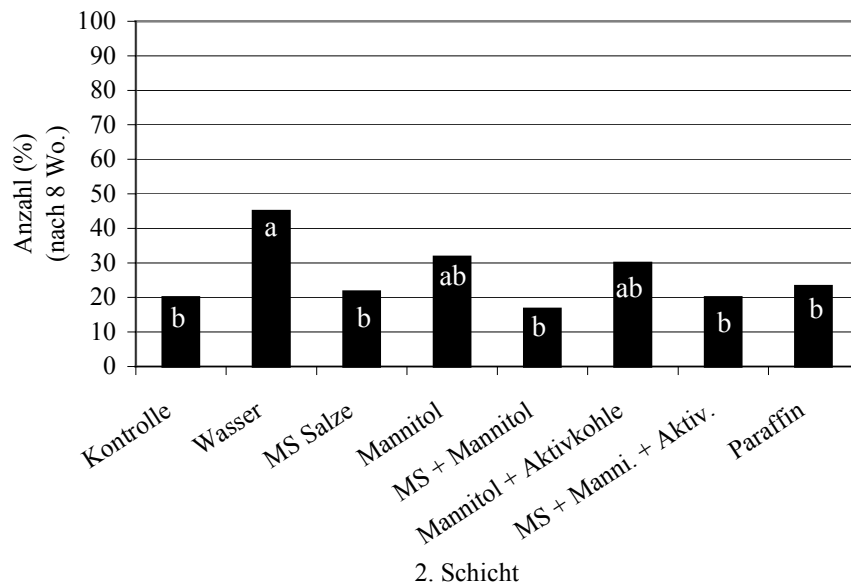


Abb. (30): Einfluss der Samenschale auf die Bewurzelung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Perlit-Wasser-Substrat unter unsterilen Bedingungen.

Insgesamt waren die Unterschiede zwischen den Varianten hinsichtlich der Nodiensegmente, die sich zu Sprossen entwickelten sehr groß. In der Kontrolle und den Varianten, die hohe Ausfälle durch Kontaminationen zu verzeichnen hatten, bildeten nur ca. 20% der Nodiensegmente Sprosse unter unsterilen Bedingungen. Bei Verwendung einer Zwei-Schicht-Kapsel und unter Zusatz von destilliertem Wasser zur zweiten Schicht wurden jedoch eine Sprossbildungsrate von 73% und eine Bewurzelungsrate von 45% erzielt. Diese Variante brachte eine signifikante Zunahme in den Spross- und Wurzelbildungsraten der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' im Vergleich mit den Varianten, die MS-Salze und/oder andere Komponenten in der zweiten Schicht enthielten bzw. mit Paraffin behandelt wurden oder im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 29 und 30).

Abbildung 31 dokumentiert, dass die eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Perlit-Wasser-Substrat unter unsterilen Bedingungen keimen und sich entwickeln konnten. Die Varianten in der linken Abbildung von rechts nach links sind: Kontrolle (Ein-Schicht-Kapsel) und MS Salze, Wasser, MS Salze + 0,2 M Mannitol, 0,2 M Mannitol, MS Salze + 0,2 M Mannitol + 0,5 g/l Aktivkohle, 0,2 M Mannitol + 0,5 g/l Aktivkohle und Paraffin in der zweiten Schicht. Die rechte Abbildung zeigt Keimung und Entwicklung der künstlichen Samen des Chrysanthemenklons 'PS 27' bei Zusatz von Wasser zur zweiten Schicht unter unsterilen Bedingungen.



Abb. (31): Keimung und Entwicklung der künstlichen Samen von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Perlit-Wasser-Substrat unter unsterilen Bedingungen bei Verwendung einer Zwei-Schicht-Samenschale.

5.6 Einkapselung von Nodiensegmenten aus dem Gewächshaus

5.6.1 Einfluss der Gelmatrixkomponenten

Die entwickelte Methode für die Einkapselung sollte auf ihre Anwendbarkeit für Nodiensegmente aus dem Gewächshaus am Beispiel von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' überprüft werden.

Einige der eingekapselten Nodiensegmente fielen durch Kontamination aus. Die Kontamination der eingekapselten Nodiensegmente aus dem Gewächshaus von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' betrug 17,8-22,2% auf einem Agar-Wasser-Medium nach der Desinfektion mit 3% Kalziumhypochlorid für 10 min.

Abbildung 32 zeigt die Entwicklung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium. Die nach der entwickelten Methode eingekapselten Nodiensegmente konnten auf einem Agar-Wasser-Medium keimen und sich entwickeln. Das Wachstum der eingekapselten Nodiensegmente aus dem Gewächshaus war sogar schneller im Vergleich zu den eingekapselten Nodiensegmente aus der In-vitro-Kultur.

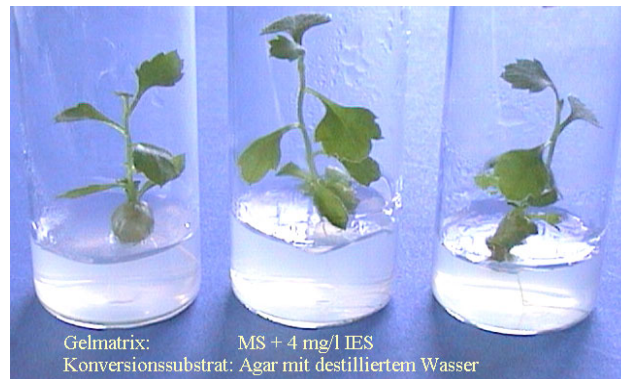


Abb. (32): Keimung und Entwicklung der eingekapselten Gewächshausnodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium bei Einsatz von MS + 4 mg/l IES als Gelmatrix.

Aus Abbildung 33 geht hervor, dass niedrige Konzentrationen von Indolessigsäure (IES) die Sprossbildung beschleunigten. Der Zusatz von 1 mg/l IES mit vollem MS-Medium zur Gelmatrix brachte nach 3, 5 und 8 Wochen Kulturdauer die maximale Sprossbildungsrate (48,9% nach 3 Wo., 60,0% nach 5 Wo., 80,0% nach 8 Wo. und 82,2% nach 12 Wo.). Die minimale Sprossbildungsrate wurde nach 3 (17,8%), 5 (28,9%) und 8 (48,9%) Wochen Kulturdauer bei Zusatz von 5 mg/l IES mit vollem MS-Medium zur Gelmatrix erlangt. Der Zusatz von 4 mg/l IES mit vollem MS-Medium zur Gelmatrix brachte nach 8 Wochen Kulturdauer eine Sprossbildungsrate von 66,7% und 75,6% nach 12 Wochen. Es gab keinen signifikanten Unterschied in den Sprossbildungsraten bei 1, 2, 3 und 4 mg/l IES mit vollem MS-Medium in der Gelmatrix. Aber es gab zu dieser Zeit einen signifikanten Unterschied in den Sprossbildungsraten bei Zusatz von 1, 2 oder 3 mg/l IES und 5 mg/l IES mit vollem MS-Medium zur Gelmatrix. Nach 12 Wochen Kulturdauer gab es keinen signifikanten Unterschied in den Sprossbildungsraten zwischen den angewendeten IES-Konzentrationen. Alle eingekapselten Gewächshausnodiensegmente, die ohne Kontamination geblieben sind, konnten nach 12 Wochen Kulturdauer auf einem Agar-Wasser-Medium bei Zusatz von 1, 2 und 3 mg/l IES mit MS-Medium zur Gelmatrix keimen. Der Einsatz von 4 mg/l IES brachte nach 12 Wochen Kulturdauer eingekapselte Nodiensegmente ohne Sprossbildung von 4,6%, während der Einsatz von 5 mg/l IES eingekapselte Nodiensegmente ohne Sprossbildung von 17,8% brachte.

Abbildung 33 zeigt auch, dass der Zusatz von 4 oder 5 mg/l IES mit MS-Medium zur Gelmatrix die maximale Bewurzelungsrate brachte. Bewurzelungsraten von 37,8% nach 3 Wochen Kulturdauer, 57,8% nach 5 Wochen, 64,4% nach 8 Wochen und 75,6% nach 12 Wochen wurden bei Zusatz von 4 mg/l IES mit vollem MS-Medium zur Gelmatrix erreicht.

Die Bewurzelungsraten erreichten nach 3 Wochen 42,2%, 57,8% nach 5 Wochen, 68,9% nach 8 Wochen und 71,1% nach 12 Wochen Kulturdauer bei Zusatz von 5 mg/l IES mit vollem MS-Medium zur Gelmatrix. Es gab nach 3, 5 und 8 Wochen Kulturdauer einen signifikanten Unterschied in den Bewurzelungsraten zwischen 4 oder 5 mg/l IES und den anderen angewendeten IES-Konzentrationen. Nach 12 Wochen Kulturdauer gab es keinen signifikanten Unterschied in den Bewurzelungsraten zwischen allen angewendeten IES-Konzentrationen. Abbildung 33 zeigt, dass die Bewurzelungsrate höher als die Sprossbildungsrate war, wenn 5 mg/l IES mit vollem MS-Medium zur Gelmatrix zugegeben wurden. Während die Spross- und Wurzelbildungsraten ähnlich waren, wenn 4 mg/l IES mit vollem MS-Medium zur Gelmatrix zugegeben wurden, da die Konversion 75,6% erreichte.

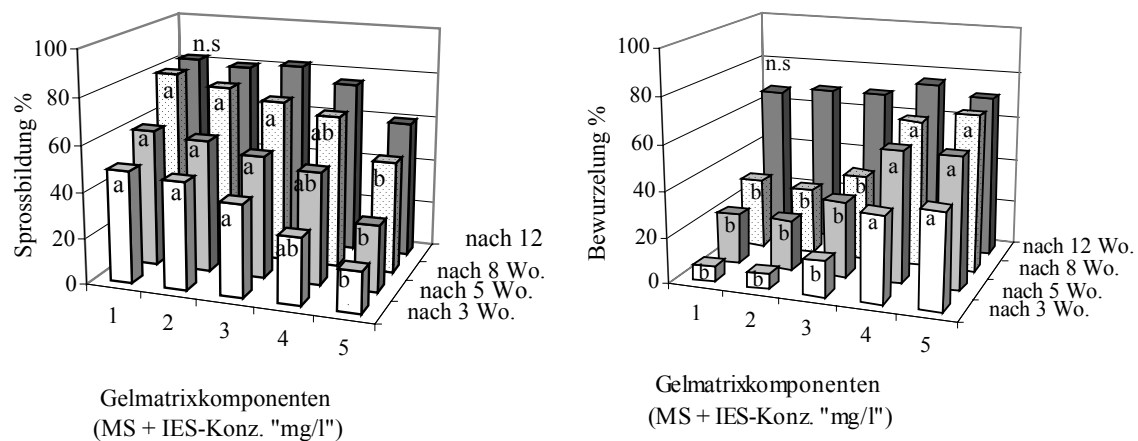


Abb. (33): Einfluss der IES-Konzentration in der Gelmatrix auf die Spross- und Wurzelbildung eingekapselter Nodiensegmente aus dem Gewächshaus von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium.

5.6.2 Übertragung der Ergebnisse auf andere *Dendranthema*-Sorten

Die für 'PS 27' ermittelte beste Variante – MS + 4 mg/l IES – sollte an weiteren *Dendranthema*-Sorten überprüft werden.

Auch in diesem Experiment fielen 16,7-23,3% der desinfizierten Nodiensegmente aus. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Dendranthema*-Sorten.

Die Sprossbildung der eingekapselten Nodiensegmente den *Dendranthema*-Sorten wies signifikante Unterschiede auf. Der *Dendranthema*-Klon 'PS 27' bildete nach 12 Wochen

Kulturdauer zu 76,7% Sprosse, während der *Dendranthema*-Klon 'Topfweiß' nur zu 33,3% Sprosse entwickelte. Die Sprossbildung der *Dendranthema*-Klone 'Snowdon Weiß' und 'Garden mum' war tendenziell besser als die von 'Topfweiß' (Abb. 34).

Andererseits zeigten die *Dendranthema*-Klone 'PS 27' und 'Garden mum' die beste Bewurzelung mit 73,3%, während die *Dendranthema*-Klone 'Snowdon Weiß' und 'Topfweiß' signifikant geringere Bewurzelungsraten hatten (20,0% bei 'Snowdon Weiß' und 36,7% bei 'Topfweiß') (Abb. 34).

Die Ergebnisse zeigten auch, dass die Fähigkeit zur Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente aus dem Gewächshaus sortenabhängig war. Der *Dendranthema*-Klon 'Garden mum' hatte mehr Wurzeln (73,3%) als Sprosse (50,0%); während beim *Dendranthema*-Klon 'Snowdon Weiß' die Bewurzelung (20,0%) schlechter als die Sprossbildung (56,7%) war. Bei den *Dendranthema*-Klonen 'PS 27' und 'Topfweiß' war die Sprossbildung ähnlich wie die Bewurzelung (76,7% Sprossbildung und 73,3% Bewurzelung bei 'PS 27', 33,3% Sprossbildung und 36,7% Bewurzelung bei 'Topfweiß') (Abb. 34).

Es wäre abschließend zu sagen, dass die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente aus dem Gewächshaus von den *Dendranthema*-Sorten abhängt. Der *Dendranthema*-Klon 'PS 27' zeigte auf einem Agar-Wasser-Medium die maximale Konversionsrate (ca. 73%) bei Einsatz von MS + 4 mg/l IES als Gelmatrix, gefolgt von 'Garden mum' (ca. 50%).

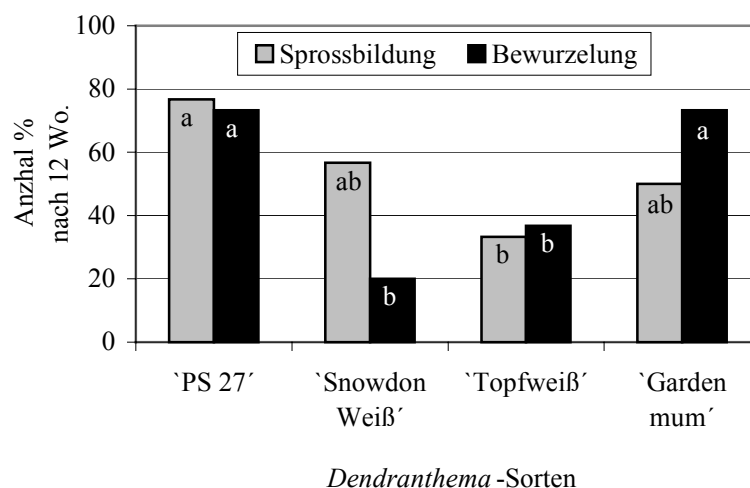


Abb. (34): Spross- und Wurzelbildung eingekapselter Nodiensegmente verschiedener *Dendranthema*-Sorten aus dem Gewächshaus auf einem Agar-Wasser-Medium bei Zusatz von MS + 4 mg/l IES zur Gelmatrix.

5.7 Lagerung der künstlichen Samen

5.7.1 Lagerung bei niedrigen Temperaturen über 0°C

Einfluss der Lagerungstemperatur

Die eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' wurden bis zu 4 Monate gelagert und wöchentlich auf ihre Vitalität überprüft. Dabei war der Erfolg der Lagerung entscheidend von der Lagertemperatur abhängig.

Die besten Ergebnisse wurden bei einer Lagertemperatur von 4°C erreicht (Tab. 23). Die Sprossbildung erreichte nach 8 Wochen Kulturdauer auf einem Agar-Wasser-Medium 75%, wenn die künstlichen Samen bei 4°C für 3 Monate in einer MS + 1,0 mg/l IES-Lösung gelagert wurden. Die künstlichen Samen konnten bei 4°C für 3 Monate gelagert werden, ohne abzusterben oder zu keimen. Bei einer Raumtemperatur von 24°C bzw. 7°C entwickelten sich schon nach 1 Woche 15% der eingekapselten Nodiensegmente zu Sprossen. Die bei Raumtemperatur (24°C) gelagerten Nodiensegmente waren nach 3 Monaten abgestorben, während noch 100% der bei 7°C gelagerten Nodiensegmente vital waren und eine Konversion von 65% in der Lagerung aufwiesen. Ca. 75% der bei 4 bzw. 7°C gelagerten Nodiensegmente konnten nach Überführung in Zimmertemperatur zur Sprossbildung angeregt werden (Tab. 23).

Alle eingekapselten Nodiensegmente waren nach 4 Monaten Lagerungsdauer in allen Varianten abgestorben (Tab. 23).

Tab. (23): Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Vitalität und Sprossbildung der künstlichen Samen von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' nach 1 Woche, 3 und 4 Monaten in einer MS + 1,0 mg/l IES-Lösung während der Lagerung und 8 Wochen nach Überführung in Zimmertemperatur (ZTemp.) auf einem Agar-Wasser-Medium.

Lager-temp.	Lagerdauer								Nach 8 Wochen in ZTemp.
	1 Woche			3 Monate			4 Monate		*Sprossbildung (%)
	Abgest. (%)	Vital. (%)	Kon-version (%)	Abgest. (%)	Vital. (%)	Kon-version (%)	Abgest. (%)	Vital. (%)	
24°C	0	100	15	100	0	55	100	0,0	0,0
7°C	0	100	15	0	100	65	100	0,0	73
4°C	0	100	0	0	100	0	100	0,0	75

* Überführung in Zimmertemperatur nach 3 Monaten Lagerdauer.

Einfluss des Lagerungsmediums

Der Einfluss des Lagermediums wurde bei 4°C untersucht, der Temperatur, die sich als die günstigste für die Lagerung erwiesen hatte.

Auch dieser Versuch bestätigte, dass die eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' maximal für 3 Monate vital waren. Nach 4 Monaten Lagerdauer waren alle eingekapselten Nodiensegmente abgestorben (Tab. 24).

Nach 3 Monaten zeigte sich aber ein deutlicher Einfluss des Lagermediums. Alle eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' blieben für 3 Monate vital, wenn sie in einer MS-Lösung mit 1,0 mg/l IES gelagert wurden. Bei Lagerung im Mineralöl waren schon viele eingekapselten Nodiensegmente (56,7%) nach 3 Monaten Lagerdauer abgestorben. Einen ebenso negativen Einfluss auf die Vitalität der eingekapselten Nodiensegmente übte Mannitol aus. Nur wenige Nodiensegmente (20%) sind nach 3 Monaten Lagerdauer im 0,5 M Mannitol vital geblieben. Im 1,0 M Mannitol waren sogar alle eingekapselten Nodiensegmente nach 3 Monaten Lagerdauer abgestorben (Tab. 24).

Abbildung 35 und 36 zeigen die Keimung und Entwicklung der künstlichen Samen von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium, nach der Lagerung auf verschiedenen Lagermedien bei 4°C für 3 Monate. Wenn MS + 1,0 mg/l IES-Lösung zur Lagerung genutzt wurde, blieben die eingekapselten Nodiensegmente vital und konnte zu 70% zur Sprossbildung angeregt werden (Abb. 35).

Tab. (24): Einfluss des Lagermediums bei 4°C auf die Vitalität der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'.

Lagermedium (Lösung) bei 4°C	Lagerdauer					
	3 Monate			4 Monate		
	Abgest. (%)	Vitalität (%)	Konversion (%)	Abgest. (%)	Vitalität (%)	Konversion (%)
Mineralöl (Paraffin)	56,7	43,3	0	100	0	0
MS + 1,0 mg/l IES	0	100	0	100	0	0
MS + 1,0 mg/l IES + 0,5 M Mannitol	80	20	0	100	0	0
MS + 1,0 mg/l IES + 1,0 M Mannitol	100	0	0	100	0	0

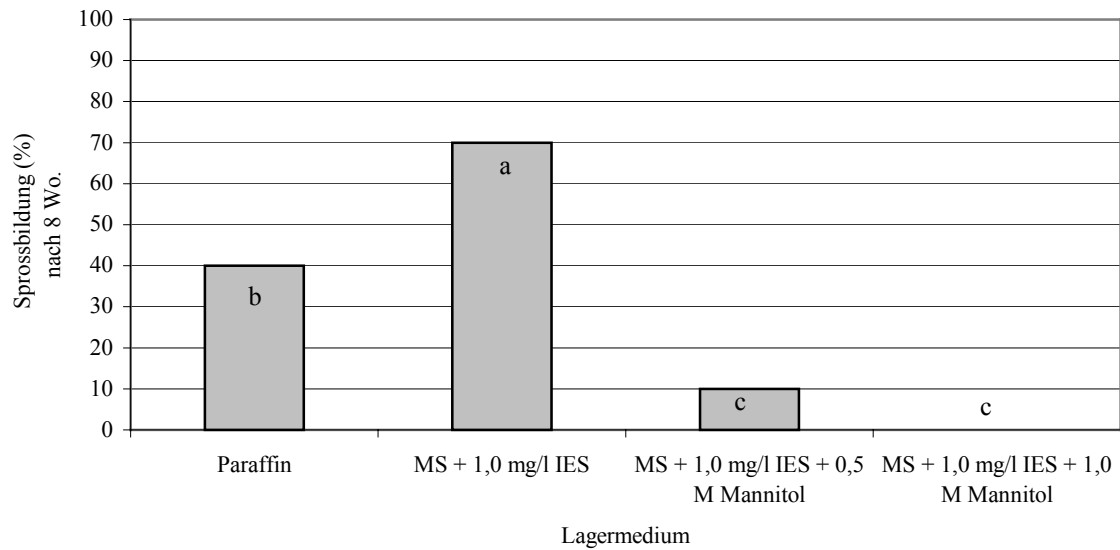


Abb. (35): Einfluss des Lagermediums bei 4°C für 3 Monate auf die Sprossbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium nach 8 Wochen Kulturdauer.

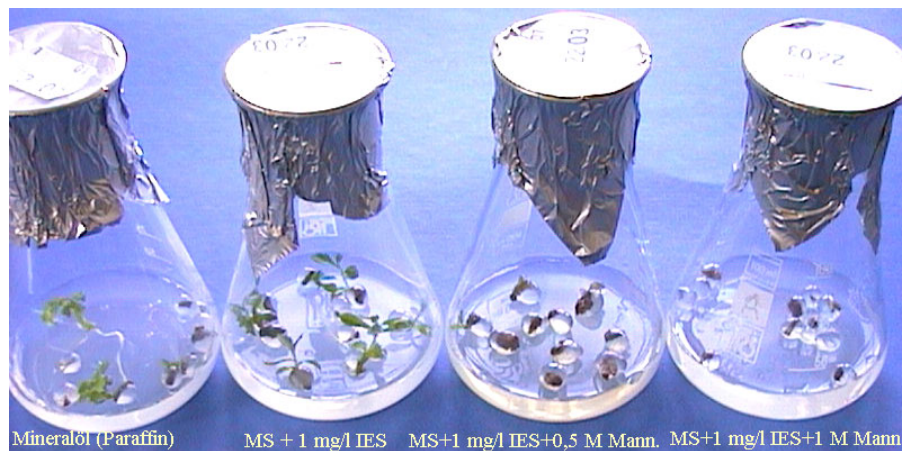


Abb. (36): Keimung und Entwicklung der k. S. von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium nach der Lagerung für 3 Monate in verschiedenen Lagerlösungen (von links nach rechts: Paraffin, MS + 1 mg/l IES, MS + 1 mg/l IES + 0,5 M Mannitol und MS + 1 mg/l IES + 1 M Mannitol) bei 4°C.

5.7.2 Lagerung durch die Kryokonservierung (Einkapselung-Dehydrierung)

Einfluss der Saccharosekonzentration (Vorbehandlung)

Für Lagerung der künstlichen Samen durch Kryokonservierung (Einkapselung-Dehydrierung) wurde untersucht, welche Saccharosekonzentration als Vorbehandlung geeignet sind, um den Wassergehalt der Nodiensegmente schonend herabzusetzen.

Tabelle 25 zeigt, dass alle untersuchten Saccharosekonzentrationen die Sprossbildung der eingekapselten Nodiensegmente negativ beeinflussten. Die Sprossbildung erreichte auf einem MS-Medium nur noch 50-60%. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Saccharosekonzentrationen direkt nach der Vorbehandlung. Die weitere Trocknung der Nodiensegmente im Luftstrom der Laminarbox verringerte die Sprossbildung dazu im Vergleich nur unerheblich.

Tab. (25): Einfluss der Saccharosekonzentration bei der Vorbehandlung und der Trocknung in der Laminarbox auf die Sprossbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem MS-Medium nach 8 Wochen Kulturdauer.

Saccharose- konzentration „M“	Sprossbildung %	
	Nach der Vorbehandlung direkt	Nach 7h in der Laminarbox
1) 0,2 + 0,4	60	60
2) 0,2 + 0,4 + 0,7	60	50
3) 0,2 + 0,4 + 0,7 + 1,0	60	55
Generelle Signifikanz	n.s.	n.s.

Tabelle 26 und 27 belegen, dass durch die Vorbehandlung mit den verschiedenen Saccharosekonzentrationen und im Luftstrom der Laminarbox, der Wassergehalt der Nodiensegmente verringert wurde. Durch die Vorbehandlung mit Saccharose für 2 bis 4 Tage wurde der Wassergehalt in den Nodiensegmenten auf 85 bis 74 % reduziert (Tab 26). Mit zunehmender Saccharosekonzentration und damit gleichzeitiger Verlängerung der Vorbehandlung nahm der Wassergehalt in den Segmenten ab. Nach dem nächsten Schritt der Vorbehandlung, der Dehydrierung der k. S. in der Laminarbox für 7h erreichte der Wassergehalt (WG) der Nodiensegmente 43,3-59,6% (Tab. 27). Der Wassergehalt (WG) der Nodiensegmente war etwas geringer, wenn mit höheren Saccharosekonzentrationen gearbeitet wurde.

Tab. (26): Einfluss der Saccharosekonzentration auf den Wassergehalt der Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'.

Sacc.-Konz. (M)	FM₁ der 50 Nodiensegmente (mg)	FM₂ nach der Saccharose- behandlung (mg)	TM 3d bei 80°C (mg)	WG (%)
1) 0,2 + 0,4	184	278	40	85,6
2) 0,2 + 0,4 + 0,7	255	387	81	79,1
3) 0,2 + 0,4 + 0,7 + 1,0	227	314	81	74,2

Tab. (27): Einfluss der Saccharosekonzentration auf den Wassergehalt der Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' nach der Dehydrierung der k. S. in der Laminarbox für 7h.

Sacc.-Konz. (M)	FM₁ der 50 Nodiensegmente (mg)	FM₂ nach 7h Laminarbox (mg)	TM 3d bei 80°C (mg)	WG (%)
1) 0,2 + 0,4	198	104	42	59,6
2) 0,2 + 0,4 + 0,7	283	120	68	43,3
3) 0,2 + 0,4 + 0,7 + 1,0	258	163	86	47,2

Einfluss der Dehydrierungsdauer

Im letzten Experiment erreichte der Wassergehalt in den Nodiensegmenten nach der Dehydrierung der k. S. in der Laminarbox für 7h 43-59%. Deshalb sollte in diesem Versuch untersucht werden, ob durch eine verlängerte Dehydrierungsdauer der Wassergehalt in den Kapseln weiter gesenkt werden kann. Die eingekapselten Nodiensegmente wurden mit 0,2 + 0,4 + 0,7 + 1,0 M Saccharose vorbehandelt.

Tabelle 28 zeigt, dass es in der Tendenz eine Abnahme im Wassergehalt der Kapseln mit zunehmender Dehydrierungsdauer (6h, 7h und 8h) gab. Der Wassergehalt konnte bis auf 20,7% gesenkt werden.

Der Wassergehalt erreichte in diesem Experiment mit ca. 20% die in der Literatur angegebenen Werte. Die Kapseln wurden deshalb für die Kryokonservierung verwendet. Nach dem Wiederauftauen und der Erholungsphase zeigte sich jedoch, dass alle Nodiensegmente abgestorben waren.

Die Lagerung der künstlichen Samen durch die Kryokonservierung (Einkapselung-Dehydration) ist von mehreren Faktoren abhängig, wie z.B. Vorbehandlung, Dehydrierungsdauer, Stickstoffbehandlung, Tauen und Inkubationsdauer der k. S. im Dunkeln vor dem Erholungsvorgang. Deshalb benötigt die Lagerung der k. S. durch die Kryokonservierung (Einkapselung-Dehydration) noch weitere Vorarbeiten.

Tab. (28): Einfluss der Dehydrierungsdauer der k. S. in der Laminarbox auf den Wassergehalt der Kugeln von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27'.

Dehydrierungs- dauer (h)	FM₁ der 50 Kugeln (g)	FM₂ nach der Dehydrierung (g)	TM „3d bei 80°C“ (g)	WG (%)
6	9,549	3,693	2,754	25,43
7	8,778	3,183	2,487	21,87
8	8,532	2,991	2,371	20,73

6 Diskussion und Schlussfolgerungen

6.1 Zum erreichten wissenschaftlichen Stand und Schlussfolgerungen für die weitere Bearbeitung

6.1.1 Bewertung der wesentlichen Ergebnisse

Es sind bisher keine Versuche zur Vermehrung von *Dendranthema*-Pflanzen durch künstliche Samen bekannt. Für *Rosa* wurden zwei Versuche zur Vermehrung durch künstliche Samen publiziert (LYNCH *et al.*, 1996; JAYASREE *et al.*, 1997). Die Konversionsrate der k. S. von *Rosa* war aber sehr gering (ca. 25% auf einem MS-Medium in beiden Arbeiten). Deshalb war das Ziel der Untersuchungen, Methoden zur Einkapselung der Nodiensegmente von *Dendranthema* und *Rosa* am Beispiel von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27', 'Snowdon Weiß', 'Topfweiß' und 'Garden mum' und *Rosa hybrida* 'Kardinal' zu entwickeln, die für die Konversion unter In-vitro- und Ex-vitro-Bedingungen geeignet sind und die die Lagerung der künstlichen Samen ermöglichen.

Es konnten in dieser Arbeit zwei wichtige Zierpflanzen (*Dendranthema* und *Rosa*) durch eingekapselte Nodiensegmente vermehrt werden. Die eingekapselten Nodiensegmente keimten und entwickelten sich unter In-vitro- und Ex-vitro-Bedingungen (Abb. 12, 13, 20, 23, 24, 25, 26, 29, 32, 33 und 34). Die Konversionsrate der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' erreichte auf Agar, Sand, Kies, Perlit und Vermiculit mit destilliertem Wasser unter sterilen Bedingungen 100% (Abb. 12, 13, 23 und 24). In gleicher Weise erfolgte die Konversion der künstlichen Samen der anderen 12 *Dendranthema*-Sorten ('Snowdon Weiß', 'Topfweiß', 'Garden mum', 'Bronze', 'Minstrel', 'Miral', 'Trumpf', 'Tauben', 'Branglow', 'Branbeach', 'Evelyn' und 'Majola') auf einem Sand-Wasser-Substrat unter sterilen Bedingungen zu 100% (Abb. 25 und 26). Bei *Rosa* erreichte die Konversionsrate auf einem Agar-Wasser-Medium fast 60% (Abb. 20). Dieses Ergebnis stellt einen neuen Wert dar im Vergleich zu den Ergebnissen von LYNCH *et al.* (1996) mit eingekapselten Sprossspitzen von *Rosa* und JAYASREE *et al.* (1997) mit eingekapselten, somatischen Embryonen von *Rosa*, da die Konversionsrate der k. S. von *Rosa* mit ca. 25% auf einem MS-Medium sehr gering war. Man müsste jedoch noch weitere Experimente durchführen, um eine 100 %ige Konversion zu erzielen.

Betrachtet man zunächst den Einfluss der untersuchten Faktoren auf die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema* und *Rosa*, so ergibt sich Folgendes: die Qualität des Pflanzenmaterials, das Konversionssubstrat, die Gelmatrixkomponenten (Na-Alginatkonzentration, Nährsalze, Saccharosekonzentration und Wachstumsregulatoren) und Samenschale beeinflussten die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente. Die Wirkung dieser Faktoren auf die Konversion der k. S. war von der Pflanzenart abhängig. *Rosa* hatte z.B. andere Ansprüche an die Nährstoffversorgung und die Zugabe von Wachstumsregulatoren als *Dendranthema*.

Die Qualität der Nodiensegmente (Explantate) hatte einen ganz entscheidenden Einfluss auf die Konversion der künstlichen Samen. Es wurden bisher kaum Qualitätsmerkmale bei der Verwendung von Nodiensegmenten als Explantate für die Einkapselung beschrieben. In den meisten Untersuchungen wurde die Qualität der Nodiensegmente nur über deren Länge definiert (SAJINA *et al.*, 1997; BALLESTER *et al.*, 1997). Es gibt bisher nur einen bekannten Versuch zum Einfluss der Subkulturdauer (Alter des Pflanzenmaterials) auf die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente (ARIAS, 1999). Sie berichtete, dass die Konversion der Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'Snowdon Weiß', 'Topfweiß' und 'Garden mum' bei Verwendung von 5 oder 6 Wochen altem Pflanzenmaterial schneller und besser war als bei 7 oder 8 Wochen altem Pflanzenmaterial. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigten, dass die Qualität des Pflanzenmaterials (Subkulturdauer und Position des Pflanzenmaterials am Spross) eine wichtige Rolle bei der Konversion der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema* und *Rosa* spielt. Bei *Dendranthema* brachte die Verwendung von 5 Wochen altem Pflanzenmaterial als Explantate für die Einkapselung die maximale Konversionsrate (Abb. 6). Das bestätigt die Ergebnisse von ARIAS (1999). Die Rosen wuchsen nicht gut, wenn das Pflanzenmaterial 5 Wochen alt war. Die Position des Pflanzenmaterials am Spross hatte ebenfalls einen Einfluss auf die Konversion der Nodiensegmente von *Dendranthema*. Die Konversion war bei den Sprossspitzen schneller und besser als bei den Nodiensegmenten (Abb. 7). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Angaben von Lee *et al.* (1990), PICCIONI & STANDARDI (1995), BALLESTER *et al.* (1997), MICHELI *et al.* (1998), CAPUANO *et al.* (1998) und ARIAS (1999).

Entscheidende Fortschritte konnten bei der Kultivierung der k. S. unter unsterilen Bedingungen erzielt werden. Durch die Verwendung einer Zwei-Schicht-Kapsel erreichte die

Sprossbildungsrate der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Perlit-Wasser-Substrat 73% (Abb. 29). Diese Ergebnisse sind hervorzuheben, da keine Antibiotika oder Fungizide der Kapsel bei der Aussaat der k. S. unter unsterilen Bedingungen zugesetzt wurden. Ähnliche Ergebnisse erzielten nur KINOSHITA & SAITO (1992) mit einer Zwei-Schicht-Kapsel bei *Betula platyphylla* auf einem Perlit-Wasser-Substrat unter unsterilen Bedingungen. Sie berichteten von einer Konversionsrate um 78%.

Bisher kaum bearbeitet wurde die Einkapselung von Nodiensegmenten aus dem Gewächshaus. In dieser Arbeit wurden *Dendranthema*-Nodiensegmente aus dem Gewächshaus mit Erfolg (ca. 75% Konversion auf einem Agar-Wasser-Medium) eingekapselt (Abb. 32, 33 und 34). Die Kontaminationsrate lag bei ca. 20%. Damit können diese Ergebnisse positiv bewertet werden, da alle eingekapselte Nodiensegmente, die nicht kontaminiert waren, Spross und Wurzeln bildeten. Das Wachstum der Nodiensegmente aus dem Gewächshaus war sogar stärker als das der Nodiensegmenten aus der In-vitro-Kultur (Abb. 13 und 32). Diese Ergebnisse sind besser als die Ergebnisse von PATTNAIK *et al.* (1995) mit *Morus*, da die eingekapselten Nodiensegmente von *Morus indica*, *M. multicaulis* und *M. bombycis* aus dem Freiland auf einem Agar-Wasser-Medium keine Sprosse bilden konnten und die Wurzelbildungsrate auf einem Agar-Wasser-Medium nur 20% bis 55% erreichte.

Die eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema* konnten bei 4°C in einer MS + 1,0 mg/l IES-Lösung für 3 Monate gelagert werden, ohne abzusterben oder zu keimen. Das ist eine ausreichende Zeit für den internationalen Pflanzen-Transport, der normalerweise durch Luft-Fracht oder Flugzeug erfolgt. Die Sprossbildung erzielte auf einem Agar-Wasser-Medium 70-75%. Damit kann die Einkapselungstechnik in der Erhaltung der genetischen Ressourcen von *Dendranthema* verwendet werden. Viele Autoren (BAPAT *et al.*, 1987; KINOSHITA & SAITO, 1990; LULSDORF *et al.*, 1993; HASAN & TAKAGI, 1995; MICHELI *et al.*, 1998) konnten die k. S. bei 4°C nur für eine kürzere Zeit (15-45 Tage) lagern.

Versuche wurden in dieser Arbeit für die Verbesserung der Lagerdauer der k. S. durch die Einkapselung-Dehydrierungstechnik durchgeführt, da diese Technik als eine praktische und effiziente Methode zur Langzeitlagerung des Pflanzenmaterials durch die Kryokonservierung betrachtet wird. Diese Versuche waren leider nicht erfolgreich, da alle kryokonservierten

Nodiensegmente abgestorben waren. Da der Erfolg der Einkapselung-Dehydrierungstechnik durch mehrere Faktoren beeinflusst wird und nicht alle Faktoren im Rahmen dieser Arbeit ausreichend geprüft werden konnten, sind hier weitere Versuche notwendig.

6.1.2 Charakteristik der Grundlösungen

Verwendung von Nodiensegmenten zur Einkapselung

Sprossspitzen und Nodiensegmente wurden mit Erfolg als Explantate für die Einkapselung von *Dendranthema* und *Rosa* verwendet und waren ausgezeichnete Explantate für die Vorbereitung von künstlichen Samen. Da bei der Verwendung von Sprossspitzen und Nodiensegmenten in der Mikrovermehrung von einer höheren genetischen Stabilität ausgegangen werden kann (MATHUR *et al.*, 1989; PATTNAIK *et al.*, 1995; HARTMANN *et al.*, 1997) im Vergleich zu somatischen Embryonen, die eine erhöhte somaklonale Variabilität zeigen (BUSH *et al.*, 1976; HARTMANN *et al.*, 1997; JALIGOT *et al.*, 2000), sollten Sprossspitzen bzw. Nodiensegmente für die Verklonung bevorzugt werden. Außerdem ist bisher die Induktion somatischer Embryonen bei *Dendranthema* sehr schwierig (MAY & TRIGIANO, 1991; PAVINGEROVA *et al.*, 1994; SHINOYAMA *et al.*, 1997).

Durch die Verwendung von Nodiensegmenten als Explantate für die Einkapselung konnten auch *Dendranthema*-Nodiensegmente aus dem Gewächshaus direkt eingekapselt werden und dadurch die Phase der In-vitro-Kultur, die zu einer erhöhten Variabilität des Materials beitragen kann, umgangen werden.

Bedeutung des Pflanzenmaterials für die Konversion

Die Konversion des Pflanzenmaterials setzt voraus, dass es ausreichend mit Nährstoffen versorgt und entwicklungsbereit ist. Günstig wäre, wenn die Nodiensegmente selbst Reservestoffe enthielten. Es wurde deshalb der Einfluss der Qualität des Pflanzenmaterials untersucht. Dabei wurden auch Knospen aus dem Gewächshaus in die Untersuchungen einbezogen.

Es gibt bisher nur einen bekannten Versuch bei PATTNAIK *et al.* (1995) mit *Morus* zur Einkapselung von Nodiensegmenten aus dem Freiland, während bisher kein Vergleich zwischen den eingekapselten Nodiensegmenten aus dem Freiland oder aus dem Gewächshaus

und eingekapselten Nodiensegmenten aus der In-vitro-Kultur durchgeführt wurde. Die eingekapselten Gewächshausnodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' konnten auf einem Agar-Wasser-Medium keimen und sich entwickeln. Es konnten im Vergleich zu eingekapselten Nodiensegmenten aus der In-vitro-Kultur jedoch nur 75% zur Konversion gebracht werden (Abb. 33). Die Ursache dafür ist die Kontamination der Gewächshausknospen, wodurch 17,8-22,2% der eingekapselten Knospen ausfielen. Die Desinfektion wurde mit 3% Kalziumhypochlorid für 10 min durchgeführt. Es wäre daher eine höhere Kalziumhypochloridkonzentration zu verwenden und/oder die Desinfektionsdauer zu erhöhen, um der Anteil der Kontamination von Nodiensegmenten aus dem Gewächshaus zu minimieren.

Die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente aus der In-vitro-Kultur war schneller im Vergleich zu den eingekapselten Nodiensegmenten aus dem Gewächshaus (Abb. 12 und 33). Diese Ergebnisse können wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, dass die Teilungsfähigkeit von In-vitro-Sprosszellen besser war als bei den Gewächshausnodiensegmenten, da die In-vitro-Sprosse sehr weich und wuchsfreudig waren. Andererseits waren die Sprosse aus den eingekapselten Nodiensegmenten aus dem Gewächshaus kräftiger und länger als aus den eingekapselten Nodiensegmenten aus der In-vitro-Kultur (Abb. 13 und 32). Das kann vielleicht darauf zurückgeführt werden, dass die Nodiensegmente aus dem Gewächshaus mehr Nährstoffe mitbringen als die Nodiensegmente aus der In-vitro-Kultur, da die Nodiensegmente aus dem Gewächshaus dicker waren als die Nodiensegmente aus der In-vitro-Kultur. Aus Abb. 33 erkennt man, dass die Spross- und Wurzelbildung von eingekapselten Gewächshausnodiensegmenten besser wird, wenn die Inkubationsdauer zunahm, da sie langsamer wuchsen als die Nodiensegmente aus der In-vitro-Kultur, deshalb wurden die Daten bis zur zwölften Inkubationswoche registriert.

Da der Zusatz von 4 mg/l IES mit vollem MS-Medium zur Gelmatrix für *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' die beste Variante war (Abb. 33), sollte diese Variante auf andere *Dendranthema*-Sorten übertragen werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Kontaminationsrate 16,7-23,3% betrug und es bei diesem Parameter keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Dendranthema*-Sorten gab. Aus Abb. 34 ist zu entnehmen, dass es jedoch große Unterschiede in der Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente aus dem Gewächshaus zwischen den verschiedenen *Dendranthema*-Sorten gab. Der *Dendranthema*-Klon 'PS 27' zeigte auf einem Agar-Wasser-Medium die maximale

Konversionsrate (ca. 73%), gefolgt von 'Garden mum' (ca. 50%), während die *Dendranthema*-Klone 'Snowdon Weiß' und 'Topfweiß' minimale Konversionsraten (20% bei 'Snowdon Weiß' und 33% bei Topfweiß') zeigten. Dieses unterschiedliche Spross- und Wurzelbildungsverhalten könnte wahrscheinlich auf den unterschiedlichen Nährstoff- und Hormonstatus von Gewächshausnodiensegmenten der *Dendranthema*-Sorten zurückgeführt werden, da keine Unterschiede im Konversionsverhalten zwischen den *Dendranthema*-Sorten bei den eingekapselten Nodiensegmente aus der In-vitro-Kultur gab. ABDIN (1995) berichtete, dass der Nährstoff- und Hormonstatus von Mutterpflanzen eine wichtige Rolle in der Bewurzelung der Stecklinge von *Ficus spp.* spielt. PATTNAIK *et al.* (1995) fanden auch einen Zusammenhang zwischen den verschiedenen *Morus*-Sorten und der Konversion der eingekapselten Nodiensegmente aus dem Freiland.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass die Qualität des Pflanzenmaterials (Subkulturdauer und Position der Nodiensegmente am Spross) einen deutlichen Einfluss auf die Konversion der künstlichen Samen hatte (Abb. 6 und 7).

Aus Abb. 6 ist zu entnehmen, dass die Konversion abnahm, wenn die Subkulturdauer zunahm. Die maximale Konversionsrate der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema* wurde beim jüngsten untersuchten Pflanzenmaterial (5 Wochen altes Pflanzenmaterial) erlangt. Das bestätigt die Ergebnisse von ARIAS (1999). Bei *Rosa* war es sogar vorteilhaft, 3 Wochen altes statt 5 Wochen altes Pflanzenmaterial zu verwenden. Die Rosen-Sprosse waren nach 3 Wochen sehr weich und wuchsfreudig. Es wäre erforderlich, einen direkten Vergleich unter gleichen Bedingungen zwischen 3 und 5 Wochen altem Pflanzenmaterial vorzunehmen. Vielleicht sind diese Ergebnisse darauf zurückzuführen, dass die Pflanzenzellen beim alten Pflanzenmaterial hinsichtlich ihrer Teilungsfähigkeit schwach sind. Es wäre vielleicht sinnvoll, bei *Dendranthema* auch 3 bzw. 4 Wochen altes Pflanzenmaterial zu testen.

Der Explantattyp (Sprossspitze bzw. Nodiensegment) hatte auch einen Einfluss auf die Konversion der Nodiensegmente von *Dendranthema*. Die Konversion war bei den Sprossspitzen schneller und besser als bei den Nodiensegmenten (Abb. 7). Dieses unterschiedliche Konversionsverhalten von Sprossspitzen und Nodiensegmenten bestätigt die Ergebnisse von Lee *et al.* (1990), PICCIONI & STANDARDI (1995), BALLESTER *et al.* (1997), MICHELI *et al.* (1998), CAPUANO *et al.* (1998) und ARIAS (1999). Sie berichteten,

dass die Konversion der eingekapselten Sprossspitzen schneller und besser war als die der Achselknospen. Die eingekapselten Sprossspitzen konnten auch länger als Achselknospen gelagert werden (MICHELI *et al.* 1998). Dieses unterschiedliche Verhalten wird wahrscheinlich mit dem physiologischen Status der Knospen in Verbindung stehen, ihrem Alter und dem Grad von Dormanz (DE KLERK, 1992; VAN TELGEN *et al.*, 1992; FERRADINI *et al.*, 1996; CAPUANO *et al.*, 1998).

Applikation der zur Konversion benötigten Nährstoffe ausschließlich über die Gelmatrix

Zur Unterstützung der Entwicklung von Sprossen und Wurzeln aus den Nodiensegmenten müssen Nährstoffe appliziert werden. Weder die Nodiensegmente der Chrysanthemen noch der Rosen konnten sich ohne Nährstoffzugabe entwickeln.

Dabei konnten die Nährstoffe über das Substrat angeboten werden. Die eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' keimten und entwickelten sich auf einem Agar- oder Perlit- mit vollem MS-Medium, obwohl die Kapseln keine Nährstoffe enthielten (Abb. 8). In dieser Weise verfahren die meisten Autoren. Vergleichende Untersuchungen von KINOSHITA & SAITO (1990), MACHII (1992), SHARMA *et al.* (1994) und PICCIONI & STANDARDI (1995) belegten, dass die Konversionsrate auf einem Agar-Wasser-Medium sehr gering war im Vergleich zum Agar mit Nährstoffen. Der Nachteil dieser Methode wird offensichtlich, wenn man die k. S. unter unsterilen Bedingungen ausbringen will. Dann kann man das Substrat nicht mit allen Nährstoffen versorgen, weil es sonst zu schnellen Infektionen und dem Überwachsen der k. S. mit Pilzen kommen würde.

Die Nährstoffversorgung ausschließlich über die Kapsel wird dann wichtig, wenn die Konversion der k. S. auf einem inerten, nährstoffarmen Substrat wie Perlit oder Torf erfolgen soll (vgl. auch REDENBAUGH *et al.*, 1991).

Aus Abb. 10 ist zu entnehmen, dass zunächst trotz der Zugabe der Nährstoffe zur Kapsel die Konversionsrate gering war und die eingekapselten Nodiensegmente mit Konversion nur sehr kurze Sprosse bildeten, wenn die k. S. auf einem Agar-Wasser-Medium kultiviert wurden. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Angaben von KINOSHITA & SAITO (1990), MACHII (1992), SHARMA *et al.* (1994) und PICCIONI & STANDARDI (1995). Es scheint so, als ob die Kapseln nicht genug Nährstoffe enthielten, um die Entwicklung der

eingekapselten Nodiensegmente zu ermöglichen. Es wurde vermutet, dass die zugesetzten Nährstoffe beim Herstellen der Kapseln, durch den Härtings- und Waschvorgang wieder entzogen wurden und sie ins Konversionssubstrat (nährstoffarmes Substrat wie Agar, Perlit, Sand) ausdiffundierten. Diese Vermutung wurde indirekt durch die Versuche zur veränderten Methode der Härtung der Kapseln (Abb. 11) und direkt durch die Untersuchungen zum Verlust von Nitrat aus den Kapseln bestätigt (Tab. 22).

Durch die Veränderung der Einkapselungsmethode durch Zusatz der Nährstoffe zur Gelmatrix und zur Härterlösung ohne Wäsche konnte die Sprossbildungsrate von *Dendranthema* von 78% bei der Kontrolle mit sehr kurzen Sprossen auf 100% Konversion und Sprosslängen von ca. 1,5 cm verbessert werden (Abb. 11). Es wird deutlich, dass die Nährstoffe der Gelmatrix und der Härterlösung mit oder ohne Wäsche mit gleichen Komponenten zugesetzt werden müssen. Viele Autoren (BAPAT *et al.*, 1987; BAPAT & RAO, 1990; GHOSH & SEN, 1994; SHARMA *et al.*, 1994; CASTILLO *et al.*, 1998) empfahlen eine Wäsche der Kugeln nach der Härterlösungsbehandlung, um das CaCl_2 auszuwaschen. Die höheren CaCl_2 -Konzentrationen hatten einen negativen Einfluss auf die Konversion der eingekapselten somatischen Embryonen von *Asparagus cooperi* 'Baker' (GHOSH & SEN, 1994). Unsere Beobachtungen zeigten, dass der Zusatz von MS zur Gelmatrix und zur Härterlösung ohne Wäsche weiche Wurzeln brachte im Vergleich zu den k. S. mit Wäsche, obwohl die Spross- und Wurzelbildungsrate mit Wäsche oder ohne Wäsche mit gleichen Komponenten gleich war. Deshalb wurden die Kapseln in den weiteren Experimenten drei Mal mit gleichen Gelmatrixkomponenten gewaschen, um das CaCl_2 auszuwaschen.

Eine genauere Vorstellung über die Nährstoffverhältnisse in der Kapsel konnte durch die Analyse des Nitratgehaltes gewonnen werden. Der Verlust der Nährstoffe auf einem nährstoffarmen Substrat ist gravierend und erfolgt sehr schnell, wie am Beispiel der Nitratkonzentration der Kugeln deutlich wurde (Tab. 22). Es ist erstaunlich, dass trotz dieses schnellen Verlustes, die zur Verfügung stehenden Nährstoffe ausreichen, um die Entwicklung zu ermöglichen. Schon in die ersten 24 Stunden waren fast 93% des NO_3^- ins Konversionssubstrat diffundiert. Nach 6 Tagen Inkubationsdauer waren nur noch 4% NO_3^- in den Kugeln. Dieser geringe Nährstoffgehalt reichte für die Initiation des Wachstums für *Dendranthema*, da die Konversionsrate 100% erreichte. Es wird vermutet, dass die eingekapselten Nodiensegmente Nährstoffe gespeichert hatten, die für die ersten

Entwicklungsvorgänge genutzt werden können. Nach der Bewurzelung können sie Nährstoffe aus dem Konversionssubstrat aufnehmen. Bei *Rosa* war dieser geringe Nährstoffgehalt in den Kapseln jedoch nicht ausreichend, um eine 100 %ige Konversion zu erzielen, die Konversionsrate erreichte nur ca. 60%. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Rosen höhere Ansprüche an die Nährstoffversorgung haben als die Chrysanthemen. Also müsste man noch weitere Experimente durchführen, um eine 100 %ige Konversion zu erzielen.

Da die vorliegenden Untersuchungsergebnisse bestätigten, dass die Nährstoffe aus den Kapseln ins Konversionssubstrat ausdiffundieren, müsste man den Verlust der Nährstoffe ins Konversionssubstrat minimieren. Es könnte z.B. die Samenschale entwickelt, die Nährstoffkonzentration in der Kapsel erhöht, die Kapsel vergrößert, die Kapselanzahl pro Glas oder Topf erhöht und/oder die Konversionssubstratmenge verringert werden, um den Verlust der Nährstoffe zu verringern.

Die Bedeutung der Komponenten der Gelmatrix

Die Versorgung der eingekapselten Nodiensegmente mit MS-Salzen allein reichte nicht aus, sondern es musste immer auch Saccharose in der Kapsel vorhanden sein (Abb. 10). MATHUR *et al.* (1989), BAPAT & RAO (1990), LEE *et al.* (1990), HASAN & TAKAGI (1995), PATTNAIK *et al.* (1995) und BALLESTER *et al.* (1997) hatten Nährsalze mit oder ohne Zucker der Gelmatrix zugesetzt und fanden, dass die Konversion der k. S. bei Zusatz von Nährsalzen mit Saccharose zur Gelmatrix besser war als die Nährsalzzugabe allein. Die vorliegenden Ergebnisse für *Dendranthema* (Abb. 10) zeigten jedoch erstmals, dass die Zugabe von MS-Salzen zur Gelmatrix einen stärkeren fördernden Einfluss auf die Sprossbildung hatte als die Zuckerzugabe. Die Sprossbildungsrate der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema* erreichte bei Zusatz von MS-Salzen allein zur Gelmatrix 58%, während bei Zuckerzugabe 30% erzielt wurden (Abb. 10). Vielleicht sind diese Ergebnisse auf die Anwesenheit von Stickstoff in den MS-Salzen zurückzuführen, da der Stickstoff die Sprossbildung fördert, während Zucker die Wurzelbildung fördert (STOLTZ, 1967; REUVENI & ADATO, 1974; ABDIN, 1995). Die vorliegenden Ergebnisse bei *Rosa* bestätigten auch, dass der Zusatz von Zucker zur Gelmatrix die Wurzelbildung förderte, insbesondere in den höheren Konzentrationen (Abb. 17).

Bei *Rosa hybrida* 'Kardinal' genügte der Zusatz der im MS-Medium üblichen Saccharosekonzentration von 3% nicht, um die Entwicklung der Nodiensegmente zu unterstützen (Abb. 17). Durch eine höhere Saccharosekonzentration von 80 g/l bzw. 90 g/l Saccharose konnte die Konversionsrate auf fast 60% auf einem Agar-Wasser-Medium erhöht werden. Diese Ergebnisse zeigten eine deutliche Abhängigkeit der Konversion vom Saccharosegehalt in der Gelmatrix. KINOSHITA & SAITO (1990), BAPAT & RAO (1990) und BALLESTER *et al.* (1997) und sowie unsere Ergebnisse mit *Dendranthema x grandiflorum* (Abb. 10) zeigten, dass der Zucker eine wichtige Rolle in der Konversion der k. S. spielt. KINOSHITA & SAITO (1990) hatten 22–39% Saccharose der Gelmatrix zugesetzt und konnten mit diesen Mengen an Saccharose die Konversion fördern, wenn die k. S. von *Betula platyphylla* auf einem Agar-Wasser-Medium kultiviert wurden.

Es sind bislang keine Versuche bekannt zum Einfluss der Konzentration der MS-Salze in der Kapsel auf die Konversion der künstlichen Samen. RAO & SINGH (1991) haben den Einfluss der MS-Salze im Konversionssubstrat auf die Konversion der eingekapselten somatischen Embryonen von *Solanum melongena* untersucht. Die Konversion war bei Einsatz der vollen Konzentration der MS-Salze besser als bei der halben Konzentration der MS-Salze. Unsere Untersuchungsergebnisse zeigten zum ersten Mal, dass die Konzentration der MS-Salze in der Kapsel einen stärkeren Einfluss auf die Sprossbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* hatte (Abb. 10). Die Konversion war bei Zugabe der vollen Konzentration der MS-Salze mit Vitaminen und Saccharose zur Gelmatrix besser als bei der Reduktion des Salzgehaltes auf die Hälfte (Abb. 10).

Während die Sprossbildung bei *Dendranthema* schon nach 1 Woche begann, dauerte es länger (ca. 3 Wochen), bis Adventivwurzeln gebildet wurden. Die Sprossbildung der Nodiensegmente musste nicht durch Wachstumsregulatoren unterstützt werden. Entscheidend war dagegen die Zugabe von Auxin, um die Wurzelbildung zu stimulieren. Der Prozess der Adventivwurzelbildung war auch stärker von den beeinflussenden Faktoren abhängig, wie z.B. Subkulturdauer (Abb. 6), Position des Nodiensegments (Abb. 7), Auxingehalt (Abb. 12) und Saccharosekonzentration (Abb. 17). Nur in wenigen Ausnahmen war die Wurzelbildung besser als die Sprossbildung, z.B. bei den Rosen (Abb. 16, 20). Die Wurzelbildung ist aber ganz entscheidend für die Weiterentwicklung, weil die gebildeten Wurzeln die Nährstoffe, die ins Konversionssubstrat ausdiffundieren, aufnehmen können. Jedoch muss am Ende die Spross- und Wurzelbildungsrate gleich sein (Abb. 12 und 33). Die vorliegenden

Untersuchungsergebnisse zeigten auch, dass der Zusatz von 1,0 mg/l IES zur Gelmatrix die maximale Konversionsrate der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema* aus den In-vitro-Kultursprossen brachte (Abb. 12 und 14), während es bei den Gewächshausnodiensegmenten von *Dendranthema* 4,0 mg/l IES die beste Auxinkonzentration war (Abb. 33). Bei *Rosa* brachte den Zusatz von 2,0 mg/l IBS oder 0,5 mg/l IBS + 0,4 mg/l NES zur Gelmatrix die maximale Konversionsrate (Abb. 20). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Auxinkonzentration und der Auxintyp von dem Pflanzen- und Nodiensegmenttyp (aus dem Gewächshaus oder aus der In-vitro-Kultur) abhängen.

Abschließend wäre zu sagen, dass die *Rosa hybrida* 'Kardinal' andere Ansprüche an die Nährstoffversorgung und die Zugabe von Wachstumsregulatoren hatte als *Dendranthema*. Die Nährstoffversorgung der eingekapselten Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal' muss noch weiter verbessert werden. Es könnte daher die Saccharose- und/oder MS-Salzkonzentration erhöht, die Kapseln vergrößert, die Kapselanzahl pro Glas oder Topf erhöht, die Konversionssubstratmenge verringert werden und/oder die Nodiensegmente in eine MS-Lösung mit Wachstumsregulatoren vor der Einkapselung als Vorbehandlung gelegt werden.

Entwicklung der Samenschale

Die Aussaat der künstlichen Samen unter unsterilen Bedingungen ist problematisch, da sich Mikroorganismen auf den künstlichen Samen vermehren, insbesondere wenn die künstlichen Samen Zucker enthalten. Es musste deshalb unbedingt eine Samenschale entwickelt werden. Zunächst wurden verschiedene, in der Literatur beschriebene Möglichkeiten, zur Umhüllung der ersten Schicht auf ihre Verträglichkeit in vitro geprüft. Die zweite Schicht soll das Wachstum von Mikroorganismen verhindern, die Vitalität des Pflanzenmaterials jedoch nicht beeinträchtigen.

Aus Abb. 27 ist zu entnehmen, dass die Verwendung einer zweiten geeigneten Schicht als Samenschale unabhängig von ihren Eigenschaften keinen negativen Einfluss auf die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* auf einem Agar-Wasser-Medium unter sterilen Bedingungen hatte. Die Konversion erreichte bei allen Varianten 100%. Die Entwicklung der Pflanzen war bei Zusatz von MS-Salzen mit oder ohne andere Komponenten zur zweiten Schicht aber besser (Abb. 28). Vielleicht sind diese

Ergebnisse auf die Zunahme der Nährstoffversorgung für die Nodiensegmente bei Zusatz von MS-Salzen zur zweiten Schicht zurückzuführen. Das unterstützt auch die Annahmen in Abschnitt 6.1.2.3, dass die Konzentration von MS-Salzen einen Einfluss auf die Keimung und Entwicklung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema* hat.

Da die Verwendung einer zweiten Schicht als Samenschale keinen negativen Einfluss auf die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* unter sterilen Bedingungen hatte, sollte die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* unter unsterilen Bedingungen untersucht werden.

Aus Abb. 29 ist zu entnehmen, dass es unter unsterilen Bedingungen zu starken Ausfällen durch Infektionen mit Mikroorganismen kam, insbesondere bei der Kontrolle (Ein-Schicht-Kapsel) und bei den Varianten, die MS-Salze mit oder ohne andere Komponenten in der äußeren Schicht enthielten. Der Anteil kontaminierter Kapseln erreicht bei der Kontrolle (Ein-Schicht-Kapsel) fast 50%. Über ähnliche Ergebnisse wurden von MATHUR *et al.* (1989), BAPAT & RAO (1990), GANAPATHI *et al.* (1992), MUKUNTHAKUMAR & MATHUR (1992), SHARMA *et al.* (1994) und PATTNAIK *et al.* (1995) berichtet, da sich Mikroorganismen auf den k. S. vermehren können, wenn die Kapseln Zucker enthielten. Aus unseren Untersuchungsergebnissen geht hervor, dass die Anwesenheit von MS-Salzen in der Kapsel auch die Vermehrung von Mikroorganismen auf den k. S. förderte (Abb. 29). Das bestätigt die Ergebnisse von MATHUR *et al.* (1989), die fanden, dass sich die Mikroorganismen auf den k. S. vermehren konnten, obwohl die Kapseln nur MS-Salze ohne Zugabe von Zucker und anderen organischen Substanzen enthielten. Im Gegensatz dazu fanden KINOSHITA & SAITO (1992) eine geringere Kontamination mit *Betula platyphylla*, wenn die Nährsalze mit Nodiensegmenten zur zweiten Schicht und Zucker zur ersten Schicht zugegeben wurde. Erstaunlich ist, dass die Varianten, die zusätzlich zu den MS-Salzen noch Mannitol bzw. Aktivkohle in der zweiten Schicht enthielten, noch stärker kontaminiert waren, obwohl der Zusatz von Mannitol allein, eine geringe Kontamination verursachte. Die maximale Kontaminationsrate (78,3%) wurde bei Zusatz von MS Salzen + 0,2 M Mannitol + 0,5 g/l Aktivkohle zur zweiten Schicht gefunden. Der Anteil kontaminierter Kapseln war dagegen sehr niedrig, wenn die zweite Schicht keine MS-Salze enthielt. Die Verwendung einer Zwei-Schicht-Kapsel mit Zusatz von Wasser zur zweiten Schicht brachte den niedrigsten Anteil kontaminierter Kapseln (6,7%). Das ist eigentlich auch verwunderlich, da es sicher sehr schnell zur Diffusion der Nährstoffe aus der ersten in die zweite Schicht

kommt. Aus Abb. 29 erkennt man, dass der Zusatz von Mannitol allein zur zweiten Schicht oder die Behandlung mit Paraffin eine signifikante Abnahme im Anteil kontaminierter Kapseln brachten (23% bei Mannitol und 20% bei Paraffin) im Vergleich zur Kontrolle (Ein-Schicht-Kapsel) (fast 50%). Es wird deutlich, dass Mannitol und Paraffin die Infektion mit Mikroorganismen vermindern, aber nicht verhindern kann. MUKUNTHAKUMAR & MATHUR (1992) zeigten, dass das Mineralöl das Durchsickern der Nährstoffe und das Eindringen von Mikroorganismen verhindert. Das bedeutet, dass die Paraffin-Behandlung in unserem Fall das Durchsickern der Nährstoffe nicht im Ganzen verhindert, damit konnten sich die Mikroorganismen auf den Kapseln vermehren. Es wäre daher anderes Mineralöl (schweres Paraffin) zu verwenden, was das Durchsickern der Nährstoffe und das Eindringen von Mikroorganismen verhindern würde.

Überraschend war, dass unter unsterilen Bedingungen bis zu 30% der Nodiensegmente abstarben, obwohl in vitro durch die zweite Schicht keine Schädigung des Pflanzenmaterials beobachtet wurde. Einige weitere Nodiensegmente starben zwar nicht ab, zeigten aber auch keine Entwicklung. Die meisten abgestorbenen Nodiensegmente und sich nicht entwickelnde Nodiensegmente wurden bei der Kontrolle und bei Paraffin-Behandlung gefunden. Diese Ergebnisse sind wahrscheinlich auf das Ausdiffundieren der Nährstoffe aus den Kapseln ins Konversionssubstrat (Perlit-Wasser-Substrat) zurückzuführen, da es ein nährstoffarmes Substrat war und dieses Ausdiffundieren bei Einsatz einer Ein-Schicht-Kapsel und bei der Paraffin-Behandlung schnell geschieht im Vergleich zu anderen Varianten, die eine zweite Schicht hatten. Dazu konnten die eingekapselten Nodiensegmente die ausdiffundierten Nährstoffe unter unsterilen Bedingungen nicht wieder aufnehmen, da die ausdiffundierten Nährstoffe im Konversionssubstrat vielleicht durch den Austausch gegen das Wasser, das in der Konversionsschale war, verloren gingen. In der In-vitro-Kultur passierte das nicht, da Gläser verwendet wurden. Dazu war das Volumen des Konversionssubstrates in vitro kleiner als in vivo. Es wäre daher zu untersuchen, ob die Zwei-Schicht-Kapseln in Töpfen mit Abdeckung durch eine Petrischale oder Plastikfolie unter unsterilen Bedingungen kultiviert werden könnten, ohne Wasserzugabe von unten, um den Nährstoffverlust zu verringern. Die Varianten, deren zweite Schicht nur Wasser oder Mannitol enthielten, hatten geringere Anteile abgestorbener Nodiensegmente (6,7% tot) und sich nicht entwickelnde Nodiensegmente (13,6%) (Abb. 29). Diese Ergebnisse können wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, dass sich bei Verwendung einer Zwei-Schicht-Kapsel mit Zusatz von

Wasser bzw. Mannitol zur zweiten Schicht das Ausdiffundieren der Nährstoffe ins Konversionssubstrat verzögerte.

Aus Abb. 29 und 30 ist zu erkennen, dass bei Verwendung einer Zwei-Schicht-Kapsel und unter Zusatz von Wasser zur zweiten Schicht eine Sprossbildungsrate von 73% und eine Bewurzelungsrate von 45% erzielt wurden. Das weist wiederum darauf hin, dass die Wurzelbildung störanfälliger ist als die Sprossbildung. Die Abnahme der Wurzelbildungsrate in dieser Variante ist wahrscheinlich auf den Verlust der Nährstoffe und des Auxins (IES) ins Konversionssubstrat (Perlit-Wasser-Substrat) zurückzuführen. Diese Variante brachte aber insgesamt eine signifikante Zunahme in den Spross- und Wurzelbildungsraten der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* im Vergleich mit den Varianten, die MS-Salze mit oder ohne andere Komponenten in der zweiten Schicht enthielten bzw. mit Paraffin behandelt wurden oder im Vergleich zur Kontrolle. Diese Ergebnisse können auf die Verringerung der Anteile kontaminierter Kapseln, abgestorbener Nodiensegmente und sich nicht entwickelnder Nodiensegmente bei Verwendung einer Zwei-Schicht-Kapsel und mit Zusatz von Wasser zur zweiten Schicht zurückgeführt werden.

Abschließend wäre zu sagen, dass an der Entwicklung der Samenschale noch weiter gearbeitet werden muss, was das Ausdiffundieren der Nährstoffe ins Konversionssubstrat verhindern würde. Dazu müssten die Zwei-Schicht-Kapseln in Töpfen kultiviert werden, mit der Abdeckung der Töpfe mit einer Petrischale oder mit Plastikfolie, ohne Wasserzugabe von unten, damit die ausdiffundierten Nährstoffe wieder aufgenommen würden.

Lagerung der künstlichen Samen

Es wurden zwei Faktoren, Temperatur und Lagermedium, auf ihren Einfluss auf die Lagerfähigkeit der eingekapselten Nodiensegmente untersucht. Beide Faktoren beeinflussten die Lagerdauer.

Durch die Absenkung der Lagertemperatur von 24°C auf 7°C und 4°C sollte die Wachstumsraten minimiert werden. Aus Abb. 23 ist zu erkennen, dass die beste Lagertemperatur bei 4°C gefunden wurde. Die eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS27' konnten für 3 Monate gelagert werden, ohne abzusterben oder zu keimen. Die Vitalität der eingekapselten Nodiensegmente nahm jedoch

auch bei dieser Variante ab. So erreichte die Sprossbildung 8 Wochen nach Überführung in den Wachstumsraum auf einem Agar-Wasser-Medium nur 75%. Die Lagerung der eingekapselten Nodiensegmente bei 4°C für 3 Monate ist eine genügende Zeit für den internationalen Pflanzenmaterial-Transport, der normalerweise durch Luft-Fracht passiert. Viele Autoren (BAPAT *et al.*, 1987; KINOSHITA & SAITO, 1990; LULSDORF *et al.*, 1993; SHIGETA *et al.*, 1993; HASAN & TAKAGI, 1995; MICHELI *et al.*, 1998) hatten die k. S. bei 4°C nur für eine kurze Zeit (15-90 Tage) gelagert. Diese geringere Lagerdauer kann vielleicht darauf zurückgeführt werden, dass die Einkapselung die Verfügbarkeit von Sauerstoff reduziert (LULSDORF *et al.*, 1993; BALLESTER *et al.*, 1997). Bei einer Lagertemperatur von 24°C bzw. 7°C entwickelten sich schon nach 1 Woche 15% der eingekapselten Nodiensegmente zu Sprossen. Die bei Raumtemperatur (24°C) gelagerten Nodiensegmente waren nach 3 Monaten abgestorben, während noch 100% der bei 7°C gelagerten Nodiensegmente vital waren und eine Konversion von 65% in der Lagerung aufwiesen. Diese Ergebnisse sind vielleicht darauf zurückzuführen, dass die Atmung der gelagerten Nodiensegmente bei 7°C und 24°C sehr schnell war, insbesondere bei 24°C, im Vergleich zur Atmung der bei 4°C gelagerten Nodiensegmente. BAPAT *et al.* (1987) und SHIGETA *et al.* (1993) berichteten ebenfalls, dass die Lagerung der k. S. bei 4°C besser war als bei Raumtemperatur. Die Ergebnisse zeigten auch, dass nach 4 Monaten Lagerungsdauer alle eingekapselten Nodiensegmente in allen Varianten abgestorben waren. Das kann wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, dass nach 4 Monaten Lagerungsdauer die Sauerstoffmenge im Lagermedium (MS + 1,0 mg/l IES-Lösung) zu gering war und/oder die Lagerung der k. S. in einer MS-Lösung die Pflanzenzellen schädigte. Es wäre daher zu untersuchen, ob die Lagerung der k. S. auf einem festen Lagermedium die Lagerdauer verbessern würde.

Neben der Lagertemperatur sind die Lagerbedingungen entscheidend. Es wurden deshalb in dieser Arbeit die eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' bei 4°C in verschiedenen Lagerlösungen (MS + 1,0 mg/l IES, Paraffin, MS + 0,5 mg/l Mannitol oder MS + 1,0 mg/l Mannitol) gelagert. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse bestätigten auch, dass die eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' maximal für 3 Monate bei 4°C in einer MS + 1,0 mg/l IES-Lösung vital waren, ohne abzusterben oder zu keimen (Tab. 24). SHIGETA *et al.* (1993) konnten auch die k. S. von *Daucus carota* bei 4°C in einer hormonfreien MS-Lösung für 3 Monate lagern. Aus Tab. 24 erkennt man, dass bei Lagerung der eingekapselten Nodiensegmente im Paraffin schon viele

eingekapselten Nodiensegmente (56,7%) nach 3 Monaten Lagerdauer abgestorben waren. Diese Ergebnisse können wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, dass Paraffin die Verfügbarkeit von Sauerstoff reduziert. MALEMNGANBA *et al.* (1996) zeigten, dass die Lagerung der eingekapselten Protocorme in flüssigem Paraffin die Überlebensrate nicht verbesserte. Auch Mannitol hatte einen negativen Einfluss auf die Vitalität der eingekapselten Nodiensegmente. Nur wenige Nodiensegmente (20%) sind nach 3 Monaten Lagerdauer im 0,5 M Mannitol vital geblieben. Im 1,0 M Mannitol waren sogar alle eingekapselten Nodiensegmente nach 3 Monaten Lagerdauer abgestorben (Tab. 24). Das ist vielleicht darauf zurückzuführen, dass die angewendeten Konzentrationen von Mannitol (0,5 mg/l und 1,0 mg/l) zu hoch waren und dadurch die eingekapselten Nodiensegmente starben. Tabelle 24 zeigt, dass nach 4 Monaten Lagerdauer alle eingekapselten Nodiensegmente abgestorben waren.

Insgesamt wäre zu sagen, dass die Lagerung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' bei 4°C in einer MS + 1,0 mg/l IES-Lösung die maximale Überlebens- und Sprossbildungsrate (3 Monate Lagerdauer und 70-75% Sprossbildung) brachte.

Für die Langzeitlagerung der k. S. könnte die Kryokonservierung eine ideale Methode sein, weil alle metabolischen Prozesse des gelagerten Pflanzenmaterials bei diesen tiefen Temperaturen (-196°C) gestoppt werden (ENGELMANN, 1997; WITHERS & ENGELMANN, 1998; WANG *et al.*, 2000). Es wurde in dieser Arbeit die Methode der Einkapselung-Dehydrierung für die Langzeitlagerung gewählt, da sie die bekannteste Methode zur Lagerung des Pflanzenmaterials durch die Kryokonservierung ist und bei vielen pflanzlichen Arten anwendbar ist (SHIBLI, 2000). Bei dieser Methode wird Saccharose als Osmotikum eingesetzt, damit die giftige Wirkung von anderen Gefrierschutzmitteln wie Dimethylsulfoxid (DMSO) und Glycerol vermieden werden kann (URAGAMI *et al.*, 1990; FABRE & DEREUDDRE, 1990; PLESSIS *et al.*, 1991; NIINO & SAKAI, 1992; MARTÍNEZ *et al.*, 1999; SHIBLI *et al.*, 1999). Außerdem ist die Einkapselung-Dehydrierungstechnik leichter durchzuführen als die Vitrifikationstechnik (NIINO & SAKAI, 1992; SAKAI *et al.*, 2000).

Der Wassergehalt des eingekapselten Pflanzenmaterials vor den Einfrieren in flüssigem Stickstoff (-196°C) spielt eine wichtige Rolle für die Überlebensrate nach dem Auftauen.

HITMI *et al.*, (1999) zeigten, dass die Vorbehandlung mit Saccharose den Wassergehalt von *Chrysanthemum-cinerariaefolium*-Sprossspitzen verringerte und damit auch ihre Gefriertoleranz verbesserte. NIINO & SAKAI (1992) und WANG *et al.* (2000) hatten die k. S. täglich auf ein neues Medium mit einer progressiven Zunahme der Saccharosekonzentration transferiert, um die Dehydration zu initiieren (NIINO & SAKAI, 1992). Die progressive Zunahme der Saccharosekonzentration als Vorbehandlung war schonender für das Pflanzengewebe als die direkte Einwirkung höherer Saccharosekonzentrationen (PLESSIS *et al.*, 1991; POISSONIER *et al.*, 1992; ENGELMANN *et al.*, 1994; MARTÍNEZ *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2000). Es wurden deshalb in unseren Untersuchungen die Kapseln auf vollem MS-Medium mit einer progressiven Zunahme der Saccharosekonzentration als Vorbehandlung kultiviert, um den Wassergehalt der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' zu verringern und damit auch ihre Gefriertoleranz zu verbessern. Es zeigte sich aber, dass schon während dieser Vorbehandlung alle untersuchten Saccharosekonzentrationen die Sprossbildung der eingekapselten Nodiensegmente negativ beeinflussten (Tab 25). Die Sprossbildung erreichte auf einem MS-Medium unabhängig von der verwendeten Saccharosekonzentration nur noch 50-60%. Diese Ergebnisse können vielleicht darauf zurückgeführt werden, dass die angewendeten Saccharosekonzentrationen zu hoch waren. LYNCH *et al.* (1996) berichteten, dass die höheren Saccharosekonzentrationen (0,75 M und 1,0 M Sacc.) als Vorbehandlung die Sprossbildungsrate der eingekapselten Nodiensegmente von *Rosa multiflora* reduzierte, während die geringeren Saccharosekonzentrationen (0,25 M und 0,5 M Sacc.) keinen Einfluss auf die Sprossbildung hatten. Aus Tab. 26 ist zu entnehmen, dass durch die Vorbehandlung mit Saccharose für 2 bis 4 Tage der Wassergehalt in den Nodiensegmenten auf 85 bis 74 % reduziert wurde. Das bestätigt die Ergebnisse von NIINO & SAKAI (1992) und HITMI *et al.* (1999).

Nach der Vorbehandlung mit Saccharose wird der Wassergehalt des Pflanzengewebes weiter gesenkt. Für diesen Schritt wird entweder die Luftströmung in einer Laminarbox genutzt oder die Kapsel an ein Kieselgel gelegt. Die Autoren berichteten, dass es keinen Unterschied zwischen den beiden Methoden gab (PAULET *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 2000). Es wurde in dieser Arbeit die Luftströmung in einer Laminarbox genutzt. Der optimale Wassergehalt hängt von den Pflanzentypen ab, weil diese in ihrer Toleranz gegenüber der Dehydration variieren (WITHERS & ENGELMANN, 1998; WANG *et al.*, 2000). Sehr oft wird der optimale Wassergehalt des künstlichen Samens mit ca. 20% bezogen auf das Frischgewicht

angegeben (VANDENBUSSCHE *et al.*, 1993; FUKAI *et al.*, 1994; WITHERS & ENGELMANN, 1998). Tabelle 27 zeigt, dass nach dem nächsten Schritt der Vorbehandlung, der Dehydrierung der k. S. in der Laminarbox für 7h der Wassergehalt (WG) der Nodiensegmente 43,3-59,6% erreichte.

Aus Tab. 28 erkennt man, dass es in der Tendenz eine Abnahme im Wassergehalt der Kapseln mit zunehmender Dehydrierungsdauer (6h, 7h und 8h) gab. Der Wassergehalt konnte bis auf 20,7% gesenkt werden. Der Wassergehalt erreichte in diesem Experiment mit ca. 20% die in der Literatur angegebenen Werte. Die Kapseln wurden deshalb für die Kryokonservierung verwendet. Nach dem Wiederauftauen und der Erholungsphase zeigte sich jedoch, dass alle Nodiensegmente abgestorben waren.

Es wäre abschließend zu sagen, dass die Lagerung der künstlichen Samen durch die Kryokonservierung (Einkapselung-Dehydration) durch mehreren Faktoren beeinflusst wird, wie z.B. Vorbehandlung, Dehydrierungsdauer, Stickstoffbehandlung, Tauen und Inkubationsdauer der k. S. im Dunkeln vor dem Erholungsvorgang. Deshalb benötigt die Lagerung der k. S. durch die Kryokonservierung (Einkapselung-Dehydration) noch weitere Experimente.

6.1.3 Der wissenschaftliche Neuwert der eigenen Untersuchungen

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse beinhalten den folgenden, wissenschaftlichen Neuwert:

- Es wurden bisher kaum Qualitätsmerkmale bei der Verwendung von Nodiensegmenten als Explantate für die Einkapselung beschrieben. In den meisten Untersuchungen wurde die Qualität der Nodiensegmente nur über deren Länge definiert (SAJINA *et al.*, 1997; BALLESTER *et al.*, 1997). Es gibt bisher nur einen bekannten Versuch zum Einfluss der Subkulturdauer (Alter des Pflanzenmaterials) auf die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente (ARIAS, 1999). Die vorliegenden eigenen Ergebnisse zeigten, dass die Qualität des Pflanzenmaterials (Subkulturdauer und Position des Pflanzenmaterials am Spross) einen ganz entscheidenden Einfluss auf die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema* und *Rosa* hatte. Bei *Dendranthema* brachte die Verwendung von 5 Wochen altem Pflanzenmaterial als Explantate für die Einkapselung die maximale Konversionsrate. Das bestätigt die Ergebnisse von ARIAS (1999). Die Position des Pflanzenmaterials am Spross hatte auch einen Einfluss auf die Konversion

der Nodiensegmente von *Dendranthema*. Die Konversion war bei den Sprossspitzen schneller und besser als bei den Nodiensegmenten. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Angaben von Lee *et al.* (1990), PICCIONI & STANDARDI (1995), BALLESTER *et al.* (1997), MICHELI *et al.* (1998), CAPUANO *et al.* (1998) und ARIAS (1999).

- Es konnten zum ersten Mal in dieser Arbeit *Dendranthema*-Pflanzen durch eingekapselte Nodiensegmente vermehrt werden, da bisher keine Versuche zur Vermehrung von *Dendranthema*-Pflanzen durch künstliche Samen bekannt sind.
- Die vorliegenden eigenen Untersuchungsergebnisse zeigten, dass die Konversionsrate der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema* auf allen angewendeten Konversionssubstraten (Agar, Sand, Kies, Perlite und Vermiculit mit destilliertem Wasser) unter sterilen Bedingungen 100% erreichte, wenn MS + Vit. + 3% Sacc. + 1,0 mg/l IES der Gelmatrix und der Härterlösung zugesetzt wurden. Diese Ergebnisse stellen einen guten Wert dar im Vergleich zu den Ergebnissen von MATHUR *et al.* (1989) mit *Valeriana wallichii*. Die Konversionsraten der eingekapselten Nodiensegmente von *Valeriana wallichii* erzielten auf verschiedenen Konversionssubstraten mit destilliertem Wasser 80-100%, wenn MS + Vit. + 3% Sacc. + 5 mg/l Kin. + 1,0 mg/l IES der Gelmatrix und der Härterlösung zugesetzt wurden. MUKUNTHAKUMAR & MATHUR (1992) berichteten, dass die Konversionsrate der eingekapselten somatischen Embryonen von *Dendrocalamus strictus* auf einem Agar-Wasser-Medium 96% erreichte, wenn MS-Salze + 3% Sacc. + 1,0 mg/l NES + 0,5 mg/l Kin. der Gelmatrix und der Härterlösung zugesetzt wurden. Die Konversionsrate der k. S. von *Betula platyphylla* war auf einem Agar-Wasser-Substrat auch hoch (100%), wenn Nährmedium + 0,05 mg/l IBS + 0,5 mg/l GA₃ + 0,01 mg/l IES + 0,8 mg/l Kin. + 22 bis 39% Sacc. nur der Na-Alginatlösung zugesetzt wurden (KINOSHITA & SAITO, 1990). Andererseits waren die Konversionsraten der k. S. auf einem Agar-Wasser-Substrat sehr gering (0 bis 48%, Tab. 8), wenn das Nährmedium mit Hormonen nur der Na-Alginatlösung zugesetzt wurden (MACHII, 1992 mit *Morus alba* und PICCIONI & STANDARDI, 1995 mit fünf untersuchten Gehölzkulturen). Außerdem zeigten unsere vorliegenden Ergebnisse, dass der Einsatz von MS + Vit. + 3% Sacc. + 4 mg/l IES als Gelmatrix die besten Gelmatrixkomponenten zur Konversion der eingekapselten Gewächshausnodiensegmente von *Dendranthema* war. Aus unseren Ergebnissen und denen der anderen Autoren wird deutlich, dass die Gelmatrixzusammensetzung

(Nährmedium, Saccharosekonzentration, Auxingehalt, Auxintyp) und die Einkapselungsmethode eine wichtige Rolle in der Konversion der k. S. spielen und die Kapselzusammensetzung von dem Pflanzen- und Nodiensegmenttyp (aus dem Gewächshaus oder aus der In-vitro-Kultur) abhängt. Dazu konnte in dieser Arbeit eine optimale Kapselzusammensetzung für Nodiensegmente von *Dendranthema* (MS + Vit. + 3% Sacc. + 1,0 mg/l IES) erreicht werden. Damit erreichte die Konversionsrate der eingekapselten Nodiensegmente der 13 *Dendranthema*-Sorten 100%. Insgesamt konnte also für *Dendranthema* eine weitgehende Optimierung der Ernährung der Nodiensegmente sichergestellt werden.

- Es gibt in der Literatur unterschiedliche Methoden zur Herstellung der künstlichen Samen. Bisher wurden diese Methoden jedoch nicht direkt miteinander verglichen. Es konnte zum ersten Mal in dieser Arbeit die Einkapselungsmethoden miteinander verglichen werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zugabe der Nährstoffe mit Wachstumsregulatoren zur Gelmatrix und zur Härterlösung die beste Einkapselungsmethode ist, da bei der Verwendung dieser Einkapselungsmethode die Sprossbildung von *Dendranthema* auf einem Agar-Wasser-Substrat von 78% bei der Kontrolle (Zusatz der Nährstoffe nur zur Na-Alginatlösung) mit sehr kurzen Sprossen auf 100% Konversion und Sprosslängen von ca. 1,5 cm verbessert werden konnten. Ähnliche gute Konversionsergebnisse (80-100%) wurden bei Zusatz von MS-Medium zur Gelmatrix und zur Härterlösung erlangt, wenn die eingekapselten Explantate auf einem nährstoffarmen Substrat kultiviert wurden (MATHUR *et al.*, 1989; MUKUNTHAKUMAR & MATHUR, 1992). Andererseits waren die Konversionsraten der k. S. auf einem Agar-Wasser-Substrat sehr gering (0 bis 48%, Tab. 8), wenn die Nährstoffe nur der Na-Alginatlösung zugesetzt wurden (MACHII, 1992; PICCIONI & STANDARDI, 1995). Insgesamt wäre zu sagen, dass die Einkapselungsmethode eine wichtige Rolle in der Konversion der k. S. spielt und die Zugabe der Nährstoffe zur Gelmatrix und zur Härterlösung als die beste Einkapselungs-methode zu betrachten ist.
- Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass die Nährstoffe aus den Kapseln in nährstoffarmes Konversionssubstrat ausdiffundieren. Der Verlust der Nährstoffe auf einem nährstoffarmen Substrat ist gravierend und erfolgt sehr schnell (fast 93% NO₃⁻-Verlust in den ersten 24 Stunden).
- Die Konversionsrate der eingekapselten Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal' (ca. 60% auf einem Agar-Wasser-Medium) stellt einen neuen Wert dar im Vergleich zu

den Ergebnissen anderer Autoren (LYNCH *et al.*, 1996 mit eingekapselten Sprossspitzen von *Rosa multiflora* und JAYASREE *et al.*, 1997 mit eingekapselten, somatischen Embryonen von *Rosa hybrida* 'king's ransom', da die Konversionsrate auf einem MS-Medium ca. 25% erreichte. Dieses unterschiedliche Konversionsratenverhalten könnte vielleicht auf die unterschiedlichen Gelmatrixkomponenten, *Rosa*-Sorten und den Explantattyp zurückgeführt werden.

- Bisher kaum bearbeitet wurde die Einkapselung von Nodiensegmenten aus dem Gewächshaus. Es konnte erstmals in dieser Arbeit *Dendranthema*-Nodiensegmente aus dem Gewächshaus direkt eingekapselt werden, als eine schnelle, einfache und leistungsfähige Einkapselungsmethode im Vergleich zu den Nodiensegmenten aus der In-vitro-Kultur.
- Die Konversionsrate von Gewächshausnodiensegmenten von *Dendranthema* (ca. 75% auf einem Agar-Wasser-Medium) ist besser im Vergleich zu den Ergebnissen von PATTNAIK *et al.* (1995) mit eingekapselten Nodiensegmenten von *Morus* aus dem Freiland (20-55% auf einem Agar-Wasser-Medium). Dazu ist das Wachstum der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema* aus dem Gewächshaus besser als bei den eingekapselten Nodiensegmenten von *Morus*, da die eingekapselten Nodiensegmente von *Morus* keine Sprosse bilden konnten, während alle eingekapselte Nodiensegmente von *Dendranthema*, die nicht kontaminiert waren, Sprosse und Wurzeln bildeten. Das kann vermutlich auf die Gelmatrixkomponenten und den Pflanzentyp zurückgeführt werden, da MS + Vit. + 3% Sacc. + 4 mg/l IES als Gelmatrix bei *Dendranthema* verwendet wurden, während man MS + Vit. + 3% Sacc. + 1,0 mg/l BAP als Gelmatrix bei *Morus* verwendete.
- Es konnte zum ersten Mal in dieser Arbeit ein Vergleich zwischen den eingekapselten Nodiensegmente aus dem Gewächshaus und eingekapselten Nodiensegmenten aus der In-vitro-Kultur durchgeführt werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema* aus der In-vitro-Kultur schneller und besser (100%) war als bei den eingekapselten Nodiensegmenten aus dem Gewächshaus (ca. 75%). Als Ursache dafür ist die Kontamination von Gewächshausnodiensegmenten (ca. 20%) zu nennen.
- Es konnte durch die Verwendung einer Zwei-Schicht-Kapsel mit Zusatz von Wasser zur äußeren Schicht und Nährmedium mit Saccharose zur inneren Schicht bei der Aussaat der k. S. von *Dendranthema* unter unsterilen Bedingungen die Vermehrung der

Mikroorganismen auf den k. S. (ca. 6,7%) vermindert werden. Unsere Ergebnisse zeigten auch, dass sich die Mikroorganismen auf den k. S. bei Zusatz von MS-Salzen zur zweiten Schicht (zu ca. 46-78%) vermehren konnten. Die Verwendung einer Zwei-Schicht-Kapsel und der Zusatz von Wasser zur zweiten Schicht brachte eine signifikante Zunahme in den Spross- und Wurzelbildungsraten der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema* (73% Sprossbildung und 45% Bewurzelung) im Vergleich mit den Varianten, die MS-Salze mit oder ohne anderen Komponenten in der zweiten Schicht enthielten bzw. mit Paraffin behandelt wurden oder im Vergleich zur Kontrolle (Ein-Schicht-Kapsel).

- Die vorliegenden eigenen Ergebnisse für *Dendranthema* zeigten erstmals, dass die Zugabe von MS-Salzen zur Gelmatrix einen stärker fördernden Einfluss auf die Sprossbildung hatte als die Zuckerzugabe. Die Sprossbildungsrate der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema* erreichte bei Zusatz von MS-Salzen allein zur Gelmatrix 58%, während bei Zuckerzugabe 30% erzielt wurden.
- Es sind bislang keine Versuche bekannt zum Einfluss der Konzentration der MS-Salze in der Kapsel auf die Konversion der künstlichen Samen. Unsere vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigten erstmals auch, dass die Konzentration der MS-Salze in der Kapsel einen stärkeren Einfluss auf die Sprossbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema* hatte. Die Konversion war bei Zugabe der vollen Konzentration der MS-Salze mit Vitaminen und Saccharose zur Gelmatrix deutlich besser als bei der Reduktion des Salzgehaltes auf die Hälfte.
- Es konnten in eigenen Untersuchungen eingekapselte Nodiensegmente von *Dendranthema* bei 4°C in einer MS + 1,0 mg/l IES-Lösung für 3 Monate gelagert werden. Das ist eine ausreichende Zeit für den internationalen Pflanzen-Transport, der normalerweise durch Luft-Fracht passiert. Damit kann die Einkapselungstechnik in der Erhaltung der genetischen Ressourcen von *Dendranthema* verwendet werden. Viele Autoren (BAPAT *et al.*, 1987; KINOSHITA & SAITO, 1990; LULSDORF *et al.*, 1993; HASAN & TAKAGI, 1995; MICHELI *et al.*, 1998) konnten die k. S. bei 4°C nur für eine kürzere Zeit (15-45 Tage) lagern.
- Erweiterte praktische Möglichkeiten der Verwendung künstlicher Samen werden abschließend besonders herausgestellt.

6.1.4 Vorschläge für die Weiterführung der Forschungsarbeiten

Nach Durchführung unsere Untersuchungen können die folgenden Vorschläge gemacht werden:

- Optimierung des Pflanzenmaterials Ausdehnung der Untersuchungen auf andere wichtige Pflanzenarten ist erforderlich. Für Rose 'Kardinal' ist es erforderlich, einen direkten Vergleich zwischen 3, 4 und 5 Wochen alten Pflanzenmaterial für die Einkapselung durchzuführen, um so den Einfluss des Alters des eingesetzten Pflanzenmaterials auf die Konversion zu verdeutlichen. Es wäre vielleicht sinnvoll, bei *Dendranthema* auch 3 bzw. 4 Wochen altes Pflanzenmaterial zu testen.
- Optimierung der Nährstoffversorgung Der Verlust der Nährstoffe ins Konversionssubstrat muss minimiert werden. Dazu gibt es verschiedene Ansätze. Es wäre die Samenschale zu entwickeln, um den Verlust der Nährstoffe zu verhindern, die Nährstoffkonzentration in der Kapsel könnte erhöht, die Kapsel vergrößert, die Kapselanzahl pro Glas oder Topf erhöht und/oder die Konversionssubstratmenge verringert werden.
- Die Relation von Stärke zu Stickstoff „C/N ratio“ in den Nodiensegmenten vor dem Einkapselungsvorgang sollte bestimmt werden, da dieser Anteil eine wichtige Rolle in der Spross- und Wurzelbildung spielt.
- Die Konversionsrate der eingekapselten Gewächshausnodiensegmente der *Dendranthema*-Klone 'Snowdon Weiß', 'Topfweiß' und 'Garden mum' muss noch weiter verbessert werden und man müsste noch weitere Experimente durchführen, um eine optimale Gelmatrixzusammensetzung zu finden. Es wäre daher der Einfluss der IES-Konzentrationen zu prüfen. Außerdem könnte man eine höhere Kalziumhypochlorid-konzentration verwenden und/oder die Desinfektionsdauer erhöhen, um der Anteil der Kontamination von Nodiensegmenten aus dem Gewächshaus zu minimieren.
- Die Lagerdauer der künstlichen Samen muss auch durch die Lagerung bei niedrigen Temperaturen über/unter 0°C bzw. durch die Kryokonservierung (Einkapselung-Dehydration) noch weiter verbessert werden. Es wären daher die k. S. auf einem festen Lagermedium bei 4°C oder in einer Petrischale bei -40°C oder -70°C zu lagern. Dazu müsste man alle beeinflussten Faktoren in ihrer Wirkung auf die Lagerung der k. S. durch die Einkapselung-Dehydrierungstechnik prüfen.

6.2 Schlussfolgerungen für erste praktische Anwendungen

Die Einkapselung von Nodiensegmenten stellt eine Ergänzung der Mikro-vermehrung dar und ist nicht nur eine Vorbereitung auf die Kryokonservierung

Die Verwendung der künstlichen Samen (eingekapselten Nodiensegmente) in der Vermehrung der *Dendranthema*- und *Rosa*-Pflanzen wird als eine einfache und leistungsfähige, vegetative Massenvermehrungsmethode betrachtet.

Für die Vorbereitung von beinahe 60 Kapseln mit eingekapselten Nodiensegmenten werden ca. 30-35 ml des MS-Mediums (5-10 ml für die Na-Alginatlösung und 25 ml für die Härterlösung) benötigt. Dadurch können 60 Pflänzchen mit ca. 30-35 ml Nährmedium unter In-vitro-Bedingungen hergestellt werden. Andererseits werden beinahe 250 ml MS-Medium (25 ml MS-Medium/100 ml Erlenmeyerkolben) für die Produktion der gleichen Anzahl Pflanzen benötigt, wenn nicht eingekapselte Explantate benutzt werden. Weiter kann man im Erlenmeyerkolben (100 ml) nur 6 nicht eingekapselte Explantate unterbringen, während der gleiche Raum für das Aufsetzen von 25 Kapseln genügt und die Kulturraum-Anforderung dadurch zu 1/4 reduziert wird. Auf diese Weise kann man ca. 30 Nodiensegmente als Explantate für die Einkapselung aus den 6 In-vitro-Sprossen erhalten und die Vermehrungsmethode der Pflanzen durch die eingekapselten Nodiensegmente (k. S.) erreicht dadurch eine hohe Multiplikationsrate. Diese Methode ist im Vergleich zur herkömmlichen Mikrovermehrung (ca. 12 Stecklinge aus den 6 In-vitro-Sprossen) oder zur Vermehrung durch Stecklinge aus dem Gewächshaus oder dem Freiland sehr leistungsfähig. Das herkömmliche Mikrovermehrungsverfahren besteht aus drei Schritten: Multiplikation von Sprossen (1. Schritt), Bewurzelung von Sprossen (2. Schritt) und Akklimatisation an die konventionelle Umwelt (3. Schritt). Bei der Vermehrung der Pflanzen durch eingekapselte Nodiensegmente wird nur der 1. Schritt verwendet. Das erlaubt uns, die Schritte 2 und 3 auszulassen. Das zeigt, dass die Einkapselung von Nodiensegmenten eine Ergänzung der Mikrovermehrung darstellt und nicht nur eine Vorbereitung auf die Kryokonservierung ist.

Als Applikation für unsere gegenwärtigen Untersuchungsergebnisse kann die Einkapselungstechnik für die Vermehrung und Erhaltung genetischer Ressourcen von seltenen Hybriden, Eliten-Genotypen, transformierten Pflanzen und anderen normalen Sorten von *Dendranthema* und *Rosa* verwendet werden. Auch kann diese Technik im Transport einer

großen Anzahl der Pflanzen zwischen den Ländern oder Laboren mit geringem Raumbedarf verwendet werden. Dazu kann die Verwendung von Sprossspitzen und Nodiensegmenten als Explantat für die Einkapselung eine höhere genetischen Uniformität und Stabilität und minimiert dadurch das Ereignis von somaklonalen Variationen sichern. Die entwickelte Einkapselungsmethode (Zusatz der Nährstoffe zur Gelmatrix und zur Härterlösung) kann wahrscheinlich auf eine leicht vermehrbare Zahl weiterer Pflanzenarten mit Erfolg übertragen werden. Die Kapselzusammensetzung hängt jedoch vom Pflanzentyp ab. Außerdem können die künstlichen Samen unter unsterilen Bedingungen durch die Verwendung einer Zwei-Schicht-Kapsel mit Zusatz von Zucker, Nährmedium und Wachstumsregulatoren zur ersten Schicht und vom Wasser zur zweiten Schicht kultiviert werden, ohne Zugabe von Antibiotika und/oder Fungiziden zur Gelmatrix. Die Nodiensegmente aus dem Gewächshaus können direkt gekapselt werden, als eine schnelle, einfache und leistungsfähige Einkapselungsmethode im Vergleich zu den Nodiensegmenten aus den In-vitro-Kultursprossen.

Die Einkapselung kann die herkömmliche Mikrovermehrung vollständig ergänzen, wenn Nodiensegmente aus dem Gewächshaus oder aus dem Freiland als Explantate für die Einkapselung verwendet werden. Während die Einkapselung eine Ergänzung der Mikrovermehrung darstellt, wenn Nodiensegmente aus der In-vitro-Kultur als Explantate für die Einkapselung oder für die Verbreitung auf die Kryokonservierung benutzt werden. Deshalb wird die Einkapselung als eine Alternative und Ergänzung zur Mikrovermehrung betrachtet.

Die Vorbereitung des Pflanzenmaterials

Bei der Vorbereitung des Pflanzenmaterials aus der In-vitro-Kultur verwendet man alle Sprossspitzen und Nodiensegmente (4-5 mm Länge) am Spross als Explantate für die Einkapselung von *Dendranthema* und *Rosa* mit Erfolg, obwohl die Konversion bei den Sprossspitzen schneller war als bei den Nodiensegmenten..

Aufbau und Herstellung künstlicher Samen

Verschiedene technische Hilfsmittel werden für die Herstellung der k. S. verwendet, z.B. Pipetten (MACHII, 1992; HASAN & TAKAGI, 1995; LYNCH *et al.*, 1996; BALLESTER *et al.*, 1997; JAYASREE *et al.*, 1997; CASTILLO *et al.*, 1998), Pinzetten (KINOSHITA &

SAITO, 1992; GANAPATHI *et al.*, 1992; MICHELI *et al.*, 1998; SARKAR & NAIK, 1998; SICURANI *et al.*, 2001), Spritzen (PATEL *et al.*, 2000) und Einkapselungsapparate (SAKAMOTO *et al.*, 1992). Die bei SAKAMOTO *et al.* (1992) angewendeten Einkapselungsapparate erfordern noch eine Verbesserung in der Technik, da bisher nicht alle gebildete Kapseln ein Explantat enthielten, deshalb wird eine Sortiermaschine verwendet und das kostet zusätzliches Geld. Dazu sind auch die Einkapselungsapparate sehr teuer. Durch die Nutzung der Mikropipette für die Einkapselung von *Dendranthema* und *Rosa*-Nodiensegmenten war eine einfache, schnelle und exakte Arbeitsweise im Versuchsmaßstab möglich. Die Größe der künstlichen Samen konnte genormt und somit gewährleistet werden, dass jeder Samen etwa das gleiche Volumen besaß und die gleiche Menge an Nährstoffen zur Verfügung stand.

Die Überführung der künstlichen Samen in Vivo

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigten, dass die künstlichen Samen unter In-vitro- und Ex-vitro-Bedingungen keimen und sich entwickeln konnten. Als Applikation für diese Ergebnisse kann man die gebildeten Pflänzchen nach der Konversion der k. S. unter In-vitro-Bedingungen ins Gewächshaus überführen, danach können die Pflanzen ins Freiland überführt werden. Die Aussaat der künstlichen Samen direkt im Freiland stösst bisher jedoch noch auf viele Probleme, die vor allem die Austrocknung und das Ausdiffundieren der Nährstoffe aus den Kapseln in die Erde betreffen. Es wäre daher die Samenschale weiter zu verbessern.

Lagerung des Pflanzenmaterials

Unsere gegenwärtigen Ergebnisse zeigten, dass das Pflanzenmaterial durch die Verwendung der Einkapselungstechnik in einer MS + 1,0 mg/l IES-Lösung bei 4°C für 3 Monate gelagert werden konnten. Für die Erhaltung der genetischen Ressourcen ist diese Zeit jedoch zu gering. Es muss deshalb dringend an der Kryokonservierung gearbeitet werden.

Einsatzmöglichkeiten für künstliche Samen im Gartenbau

Durch die vorliegenden Untersuchungsergebnisse könnten sich folgende Einsatzmöglichkeiten für künstliche Samen im Gartenbau ergeben :

Aus In-vitro-Vermehrungen:

- Es könnte eine schnelle, vegetative Massenvermehrung über 13 Wochen (5 Wo. Subkulturdauer + 8 Wo. Konversion) durchgeführt werden.
- Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass das Pflanzenmaterial in einer MS-Lösung bei 4°C für 3 Monate durch die k. S. gelagert werden kann.
- Durch die Einkapselung der Explantate aus der In-vitro-Kultur könnte man virusfreie Pflanzen nach 13 Wochen produzieren.
- Die Vermehrung von seltenen Hybriden, Eliten-Genotypen und transformierten Pflanzen kann in 13 Wochen erreicht und erleichtert werden.
- Durch die Einkapselung könnte man das Pflanzenmaterial zwischen den Ländern oder Laboren über 3 Monate austauschen.
- Durch die k. S. könnte man die Pflanzen, die keine natürliche Samen produzieren oder deren natürliche Samen eine Dormanz haben, vermehren.

Aus dem Gewächshaus oder Freiland:

- Es könnte eine schnelle vegetative Massenvermehrung in kleinerem Umfang über 12 Wochen (nur für die Konversion) direkt durchgeführt werden.
- Durch die Einkapselung des Pflanzenmaterials aus dem Gewächshaus oder dem Freiland könnte man auch das Pflanzenmaterial zwischen den Ländern oder Laboren über 3 Monate austauschen.
- Die Lagerung des Pflanzenmaterials könnte auch durch die Einkapselung von Nodien-segmenten aus dem Gewächshaus oder dem Freiland durchgeführt werden.

7 Zusammenfassung

Das Ziel der Untersuchungen war es, Methoden zur Einkapselung gärtnerisch wichtiger Kulturen zu entwickeln und hierfür künstliche Samen herzustellen, die für die Konversion unter In-vitro- und Ex-vitro-Bedingungen und für die Lagerung geeignet sind. Beispielfhaft wurden für die Untersuchungen zwei wichtige Zierpflanzen ausgewählt, *Dendranthema* und *Rosa*, die sich durch unterschiedliche Ansprüche auszeichnen und zugleich wirtschaftlich sehr bedeutend sind.

Ca. 4 - 5 mm lange Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27', 'Snowdon Weiß', 'Topfweiß' und 'Garden mum' wurden nach 5 Wochen Subkulturdauer aus den In-vitro-Kultursprossen als Explantate für die Einkapselung entnommen. Die 4 - 5 mm langen Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal' wurden nach 5 und 3 Wochen Subkulturdauer für die Einkapselung entnommen. Die Nodiensegmente wurden, wenn nicht anders ausgewiesen, gut mit 3% Na-Alginat gemischt, mit einer Pipette aufgenommen und in die Härterlösung (75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) getropft, und für 30 min auf einen Schüttler gestellt. Dann wurden die Kugeln dreimal mit destilliertem Wasser (jeweils ca. 20 Sec.) gewaschen. Danach waren die Kapseln auf dem Konversionssubstrat kultiviert worden.

Die erhaltenen Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Es konnte in dieser Arbeit zwei wichtige Zierpflanzen (*Dendranthema* und *Rosa*) durch eingekapselte Nodiensegmente vermehrt werden. Die eingekapselten Nodiensegmente konnten unter In-vitro- und Ex-vitro-Bedingungen keimen und sich entwickeln.
2. Alle Sprossspitzen und Nodiensegmente (ca. 4-5 mm Länge) am Spross wurden als Explantate zur Herstellung der künstlichen Samen von *Dendranthema* und *Rosa* mit Erfolg verwendet, obwohl die Konversion bei den Sprossspitzen schneller war als bei den Nodiensegmenten.
3. Die vorliegenden eigenen Ergebnisse zeigten, dass die optimale Einkapselungsmethode bei Zusatz der Nährstoffe und Wachstumsregulatoren zur Gelmatrix und zur Härterlösung erlangt wurden, mit oder ohne Wäsche mit gleichen Komponenten.

4. Die Na-Alginatkonzentration beeinflusste die Form und Festigkeit der Kapsel und die Konversion der künstlichen Samen. Der Einsatz von 3% Na-Alginat als Gelmatrix mit 75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ für 30 min als Härterlösung brachte gute Kapseln (in Form und Festigkeit) und die maximale Konversionsrate der k. S. von *Dendranthema* und *Rosa*.
5. Unsere Untersuchungsergebnisse zeigten erstmals, dass die Konzentration von MS-Salzen in der Kapsel einen deutlichen Einfluss auf die Sprossbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema* hatte. Die Konversion war bei Zugabe der vollen Konzentration der MS-Salze mit Vitaminen und Saccharose zur Gelmatrix besser als bei der Reduktion des Salzgehaltes auf die Hälfte.
6. Die vorliegenden eigenen Ergebnisse für *Dendranthema* zeigten, dass die Zugabe von MS-Salzen zur Gelmatrix einen stärkeren fördernden Einfluss auf die Sprossbildung hatte als die Zuckerzugabe.
7. Die Saccharose spielt eine wichtige Rolle in der Konversion der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema* und *Rosa*. Es gab einen positiven Zusammenhang zwischen den Konversion und Saccharosekonzentration.
8. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigten, dass die Nährstoffe aus den Kapseln in nährarmes Konversionssubstrat ausdiffundieren. Der Verlust der Nährstoffe auf einem nährstoffarmen Substrat ist gravierend und erfolgt sehr schnell, wie am Beispiel der Nitratkonzentration der Kugeln deutlich wurde.
9. Die optimale Gelmatrixzusammensetzung für *Dendranthema x grandiflorum* konnte bei Einsatz von 3% Na-Alginat als Gelmatrix und bei Zusatz von MS-Salzen, Vitaminen, 3% Saccharose und 1,0 mg/l IES zur Gelmatrix erlangt werden. Trotz sortenabhängiger Unterschiede erfolgte die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente von 13 *Dendranthema*-Sorten auf einem Agar-Wasser-Substrat zu 100%, wenn die MS-Salze, Vitamine, 3% Saccharose und 1,0 mg/l IES der Gelmatrix und der Härterlösung und der Wäsche zugesetzt wurden. Damit kann tatsächlich von einer optimalen Kapselzusammensetzung für die Konversion eingekapselter *Dendranthema*-Nodiensegmente gesprochen werden.
10. Die Konversionsrate der eingekapselten Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal' konnte auf einem Agar-Wasser-Medium zu fast 60% erzielt werden, wenn der Gelmatrix MS-Salze, Vitamine und 80 g/l bzw. 90 g/l Saccharose mit 2 mg/l IBS zugesetzt wurden.

11. Auf verschiedenen Konversionssubstraten (Agar, Sand, Kies, Perlit und Vermiculit) konnten eingekapselte Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* keimen und sich entwickeln, da die Konversionsrate auf allen untersuchten Substraten unter sterilen Bedingungen 100% erreichte.
12. Durch die Verwendung einer Zwei-Schicht-Kapsel mit Zusatz von Wasser zur äußeren Schicht und Nährmedium mit Saccharose zur inneren Schicht konnten die eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* auf einem Perlit-Wasser-Substrat unter unsterilen Bedingungen keimen und sich entwickeln. Diese Variante brachte die maximale Spross- und Wurzelbildungsrate (73% Sprossbildung und 45% Bewurzelung) und die minimale Kontaminationsrate (6,7%) auf einem Perlit-Wasser-Substrat unter unsterilen Bedingungen.
13. Es konnte zum ersten Mal in dieser Arbeit einen Vergleich zwischen den eingekapselten Nodiensegmente aus dem Gewächshaus und eingekapselten Nodiensegmente aus der In-vitro-Kultur durchgeführt werden. Die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente aus der In-vitro-Kultur war schneller und besser (100%) als bei den Nodiensegmenten aus dem Gewächshaus (ca. 75%).
14. Durch die Verwendung von Nodiensegmenten als Explantate konnten Nodiensegmente aus dem Gewächshaus direkt eingekapselt werden, als eine schnelle, einfache und leistungsfähige Einkapselungsmethode im Vergleich zu den Nodiensegmenten aus der In-vitro-Kultur. Die Fähigkeit zur Spross- und Wurzelbildung eingekapselter Gewächshausnodiensegmente hängt von den *Dendranthema*-Sorten ab. Der *Dendranthema*-Klon 'PS 27' zeigte auf einem Agar-Wasser-Medium die maximale Konversionsrate (ca. 75%) bei Einsatz von MS + 4 mg/l IES als Gelmatrix, gefolgt von 'Garden mum' (ca. 50%).
15. Die eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' konnten bei 4°C in einer MS + 1,0 mg/l IES-Lösung für 3 Monate gelagert werden. Die Sprossbildung erzielte auf einem Agar-Wasser-Medium 70-75%.
16. Erweiterte praktische Möglichkeiten der Verwendung künstlicher Samen werden abschließend besonders herausgestellt.

8. Literaturverzeichnis

- ABDIN, S. S. (1995): Effect of nutritional and hormonal status of mother plants on propagation of some *Ficus* species. Thesis Master in Horticulture (Floriculture). Egypt, Assiut University, Faculty of Agriculture, Horticulture Department, pp. 1-174.
- AHMED, H.A. & ANDREA, M. (1987): Effect of heat treatment on acceleration *Chrysanthemum* multiplication by meristem-tip culture. *Acta Hort.*, 212: 99-104.
- AITKEN-CHRISTIE, J., KOZAL, T. & SMITH, M.A.L. (1995): Glossary. In: Automation and environmental control in plant tissue culture. (Aitken-Christie, J., Kozai, J. and Smith, M. A. L., eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands 9-12.
- ARA, H., JAISWAL, U. & JAISWAL, V.S. (1999): Germination and plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of mango (*mangifera indica* L.).
- ARIAS, I. (1999): Preparation of *Chrysanthemum morifolium* cvs Topfweiß, Garden Mums and Snowdon-Weiß shoots for encapsulation. Thesis Master in Sciences degree. Humboldt University of Berlin. College of Agriculture and Horticulture, pp. 1-39.
- ARRILLAGA, I., TOBOLSKI, J.J. & MERKLE, S.A. (1994): Advances in somatic embryogenesis and plant production of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Plant Cell Reports*, 13: 171-175.
- BACHIRI, Y., GAZEAU, C., HANSZ, J., MORISSET, C. & DEREUDDRE, J. (1995): Successful cryopreservation of suspension cells by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 43: 241-248.
- BALLESTER, A., JANEIRO, L.V. & VIEITEZ, A.M. (1997): Cold storage of shoot cultures and alginate encapsulation of shoot tips of *Camellia japonica* L. and *Camellia reticulata* Lindley. *Scientia Horticulturae*, 71: 67-78.
- BAPAT, V.A., MHATRE, M. & RAO, P.S. (1987): Propagation of *Morus indica* L. (mulberry) by encapsulated shoot buds. *Plant Cell Reports*, 6: 393-395.

- BAPAT, V.A. & RAO, P.S. (1988): Sandalwood plantlets from synthetic seeds. *Plant Cell Reports*, 7: 434-436.
- BAPAT, V.A. & RAO, P.S. (1990): In vitro growth of encapsulated axillary buds of mulberry (*Morus indica* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20: 69-70.
- BAPAT, V.A. (1993): Studies on synthetic seeds of sandalwood (*Santalum album* L.) and mulberry (*Morus indica* L.) In: *Synseeds: Applications of synthetic seeds to crop improvement*. (Redenbaugh, K., Ed.). CRC Press Inc., Boca Raton, CA, USA, 381-407.
- BAZINET, C., DÜRR, C., RICHARD, G., & BARBOTIN, J.-N. (1997): From encapsulated somatic embryo to plantlet regeneration. R.H. Ellis, M. Black, A.J. Murdoch, T.D. Hong (eds.), *Basic and Applied Aspects of Seed Biology*, S. 91-94.
- BERG, G.A. VAN DEN (1980): Influence of temperature on bud break, shoot growth, flower bud atrophy and winter production of glasshouse roses. *Meded. Proefstation Aalsmeer* Nr. 93 S. 170.
- BHOJWANI, S.S. & RAZDAN, M.K. (1996): *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, a Revised Edition. Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- BINGHAM, E., L. HURLEY, D. KOUTZ & J. SAUNDERS (1975): Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. *Crop Sci.*, 15: 719-721.
- BLASKESLEY, D., AL-MAZROOEI, S. & HENSHAW, G. (1995): Cryopreservation of embryogenic tissue of sweet potato (*Ipomoea batatas*): Use of sucrose and dehydration for cryoprotection. *Plant Cell Reports*, 15: 259-263.
- BRODELIUS, P., LINSE, L. & NILSSON, K. (1982): Viability and biosynthetic capacity of immobilized plant cells. In: Fujiwara A. (ed) *Plant Tissue Culture 1982*, Proc. 5th Int. Cong. of Plant Tissue and Cell Culture Maruzen, Tokyo, pp. 371.
- BUSH, S.R., EARLE, E.D. & LANGHANS, R.W. (1976): Plantlets from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera, *Chrysanthemum morifolium* 'Indianapolis'. *Amer. J. Bot.*, 63: 729-737.
- BÜYÜKALACA, S. & MAVITUNA, F. (1995): Artificial seeds of pepper somatic embryos. *Acta Horticulturae*, 412: 106-110.

- CAPUANO, G., PICCIONI, E. & STANDARDI, A. (1998): Effect of different treatments on the conversion of M.26 apple rootstock synthetic seeds obtained from encapsulated apical and axillary micropropagated buds. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 73 (3): 299-305.
- CASTILLO, B., SMITH, M.A.L. & YADAVA, U.L. (1998): Plant regeneration from encapsulated somatic embryos of *Carica papaya* L. *Plant cell Reports*, 17: 172-176.
- CHAI, Y.M., MARZALINA, M. & KRISHNAPILLAY, B. (1994): Effect of sucrose as a cryoprotective agent in the cryopreservation of some Dipterocarp species. *Proceedings of National Biotechnology VI*.
- CROWE, J.H., CROWE, L.M., CARPENTER, J.F. & WISTROM, C.A. (1987): Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.*, 242: 1-10.
- Das Magazin für Zierpflanzenbau, 8 (2002), S. 7.
- DE JONG, J. (1984): Genetic analysis in *Chrysanthemum morifolium* L. *Euphytica*, 33: 455-463.
- DE KLERK, G.J. (1992): Hormonal control of dormancy and apical dominance in tissue-cultured plants. *Acta Botanica Neerlandica*, 41: 443-451.
- DE VRIES, D.P. & DUBOIS, A.M. (1984): Inheritance of the recurrent flowering and moss characters in F₁ and F₂ hybrid tea x *R. centifolia muscosa* populations. *Gartenbauwiss.*, 49: 97-100.
- DEREUDRE, J., FABRE, J., & BASSAGLIA, C. (1988): Resistance to freezing in liquid nitrogen of carnation (*Dianthus caryophyllus* L. var. Eolo) apical and axillary shoot tips excised from differently aged in vitro plantlets. *Plant Cell Reports*, 7: 170-173.
- DUMET, D. (1994): Cryoconservation des massifs d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) par déshydratation-vitrification. Etude du rôle du saccharose pendant le prétraitement. Thèse d'Université. Université Paris 6, 115 pp.
- EARLE, E.D. & LANGHANS, R.W. (1974): Propagation of *Chrysanthemum* in vitro. I. Multiple plantlets from shoot tips and the establishment of tissue culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 99(2): 128-132.

- ENDRESS, R. (1994): Plant Cell Biotechnology. Springer-Verlag, Berlin, 256-269.
- ENGELMANN, F. (1992): Cryopreservation of embryos. In: Dattée, Y., Dumas, C. and Gallais, A. (eds) Reproductive Biology and Plant Breeding. Springer Verlag, Berlin, pp. 281-290.
- ENGELMANN, F. (1997): In vitro conservation methods. In: Callow JA., Ford-Lloyd & Newbury H.J. (eds) Biotechnology and Plant Genetic Resources (pp. 119-161). CAB International, Oxford.
- ENGELMANN, F., BENSON, E.E., CHABRILLANGE, N., GONZALEZ-ARNAO, M.T., MARI, S., MICHAUX-FERRIE`RE, N., PAULET, F., GLASZMANN, J.C. & CHARRIER, A. (1994): Cryopreservation of several tropical plant species using encapsulation-dehydration of apices. In: Proceedings of VIIIth IAPTC Meeting, Firenze, Italy.
- FABRE, J. & DEREUDDRE, J. (1990): Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. Cryo-Letters, 11: 413-426.
- FERRADINI, N., FAMIANI, F., PROIETTI, P. & STANICA, F. (1996): Influence of growth regulators and light on in vitro shoot regeneration in M.26 apple rootstock. Journal of Horticultural Science, 71: 859-865.
- FUJII, J., SLADE, D., REDENBAUGH, K. & WALKER, K.A. (1987): Artificial seeds for plant propagation. Tibtech-December, Vol. 5.
- FUKAI, S., TOGASHI, M. & GOI, M. (1994): Cryopreservation of in vitro-grown *Dianthus* by encapsulation-dehydration. Tech. Bull. Fac. Agric. Kagawa Univ. 46: 101-107.
- GANAPATHI, T.R., SUPRASANNA, P., BAPAT, V.A. & RAO, P.S. (1992): Propagation of banana through encapsulated shoot tips. Plant Cell Reports, 11: 571-575.
- GARNER, W.W. & ALLARD, C.H. (1920): Effect of the relation length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. Journ. Agr. Res., 15: 553-601.
- GEORGE, L. & EAPEN, S. (1995): Encapsulation of somatic embryos of finger millet, *Eleusine coracana* Gaertn. Indian J. Exp. Biol., 33: 291-293.

- GHOSH, B. & SEN, S. (1994): Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Asparagus cooperi* baker. Plant Cell Reports, 13: 381-385.
- GONZALEZ-ARNAO, M.T., URRÁ, C., ENGELMANN, F., ORTIZ, R. & FE, C. (1999): Cryopreservation of encapsulated sugar cane apices: Effect of storage temperature and storage duration. Cryo-Letter 20: 347-352.
- HARTMANN, H.T., KESTER, D.E., DAVIES, F.T. & GENEVE, R.L. (1997): Plant Propagation: Principles und Practices (sixth edition), pp. 549-589.
- HASAN, S.M.Z. & TAKAGI, H. (1995): Alginate coated nodal segments of yam (*Dioscorea spp.*) for germplasm exchange and distribution. Plant Gen. Res. Newsletter, 103: 32-35.
- HILL, G.P. (1968): Shoot formation in tissue cultures of *Chrysanthemum* 'Bronze Pride'. Physiol Plant, 21: 386-389.
- HITMI, A., BARTHOMEUF, C. & SALLANON, H. (1999): Cryopreservation of *Chrysanthemum cinerariaefolium* shoot tips. Effect of Pretreatment conditions and retention of biosynthetic capacity. Cryo-lett., 20: 109-120.
- HORN, W. (1992): Micropropagation of rose (*Rosa L.*). In Bajaj, Y.P.S. (Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry 20, High-Tech and Micropropagation IV, 320-342. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- HORN, W. & LANGE, P., in HORN Zierpflanzenbau (1996): Zierpflanzenbau Handbuch, Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin. Wien, 503-518.
- JALIGOT, E., RIVAL, A., BEULE, T., DUSSERT, S. & VERDEIL, J.-L. (2000): Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. Plant Cell Reports, 19 (7): 684-690.
- JANEIRO, L.V., BALLESTER, A. & VIEITEZ, A.M. (1997): In vitro response of encapsulated somatic embryos of *Camellia*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51: 119-125.
- JANEIRO, L.V., VIEITEZ, A.M. & BALLESTER, A. (1996): Cryopreservation of somatic embryos and embryonic axes of *Camellia japonica* L. Plant Cell Rep., 15: 699-703.

- JAYASREE, N., DEVI, B.P. & REDDY, P.V. (1997): Production of synthetic seeds and plant regeneration in *Rosa hybrida* L. cv. 'King's ransom'. Indian Journal of Experimental Biology, 35: 310-312.
- KINOSHITA, I. & SAITO, A. (1990): Propagation of Japanese white birch by encapsulated axillary buds 1. Regeneration of plantlets under aseptic conditions. J. Jpn. For. Soc., 72: 166-170.
- KINOSHITA, I. & SAITO, A. (1992): Regeneration of Japanese white birch plants from encapsulated axillary buds. 5th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Kyoto Japan, May 27-30.
- LAMBARDI, M., FABBRI, A. & CACCAVALE, A. (2000): Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips. Plant Cell Reports, 19: 213-218.
- LAWRENCE, R. Jr. (1981): In vitro cloning systems. Environ Exp. Bot., 21: 289-300.
- LEE, B.C., LEE, S.K., KIM, T.S., LEE, J.S. & KIM, Y.W. (1990): Encapsulation of in vitro shoot buds with alginat in *Betula davurica*. Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea, 26: 69-74.
- LEYHE, U. & HORN, W. (1994): Ein Beitrag zur Mikrovermehrung von Rosa-Hybriden. Gartenbauwissenschaft, 59(2): 85-88.
- LLOYD, G. & MC COWN, B. (1980): Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Comb Proc Intern Plant Prop Soc., 30: 421-427.
- LULSDORF, M.M., TAUTORUS, T.E., KIKCIO, S.I., BETHUNE, T.D. & DUNSTAN, D.I. (1993): Germination of encapsulated embryos of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill.). Plant Cell Reports, 12: 385-389.
- LYNCH, P.T., HARRIS, W.C. & CHARTIER-HOLLIS, J.M. (1996): The cryopreservation of shoot tips of *Rosa multiflora*. Plant Growth Regulation, 20: 43-45.
- MACHII, H. (1992): In vitro growth of encapsulated adventitious buds in mulberry, *Morus alba* L. Japan J. Breed., 42 (3): 553-559.
- MALEMNGANBA, H., RAY, B.K., BHATTACHARYYA, S. & DEKA, P.C. (1996): Regeneration of encapsulated protocorms of *Phaius tankervilleae* stored at low temperature. Indian Journal of Experimental Biology, 34: 802-805.

- MAMIYA, K., & SAKAMOTO, Y. (2001): A method to produce encapsulatable units for synthetic seeds in *Asparagus officinalis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64: 27-32.
- MARTÍNEZ, D., TAME'S, R.S. & REVILLA, M.A. (1999): Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of hop (*Humulus lupulus* L.) using encapsulation-dehydration. *Plant Cell Reports*, 19: 59-63.
- MARUYAMA, E., KINOSHITA, I., ISHII, K., OHBA, K. & SAITO, A. (1997): Germplasm conservation of the tropical forest trees, *Cedrela odorata* L., *Guazuma crinita* Mart., and *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don., by shoot tip encapsulation in calcium-alginate and storage at 12-25 °C. *Plant Cell Reports*, 16: 393-396.
- MATHUR, J., AHUJA, P.S., LAL, N. & MATHUR, A.K. (1989): Propagation of *Valeriana wallichii* Dc. using encapsulated apical and axial shoot buds. *Plant Science*, 60: 111-116.
- MATHUR, J., MUKUNTHAKUMAR, S., GUPTA, S.N. & MATHUR, S.N. (1991): Growth and morphogenesis of plant tissue cultures under mineral oil. *Plant Sci.*, 74: 249-254.
- MAY, R.A. & TRIGIANO, R.N. (1991): Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 116: 366-371.
- MICHELI, M., MENCUCCINI, M. & STANDARDI, A. (1998): Encapsulation of in vitro proliferated buds of olive. *Adv. Hort. Sci.*, 12: 163-168.
- MUKUNTHAKUMAR, S. & MATHUR, J. (1992): Artificial seed production in the male bamboo (*Dendrocalamus strictus* L.). *Plant Science*, 87: 109-113.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- MURASHIGE, T., BARZ, W., REINHARD, E. & ZENK, M.H. (1977): In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, pp. 392-403 (eds J. Reinert and Y.P.S. Bajaj). Berlin: Springer-Verlag.
- NIINO, T. & SAKAI, A. (1992): Cryopreservation of alginate-coated in vitro-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. *Plant Sci.*, 87: 199-206.

- NORMAH, M.N. & MARZALINA, M. (1995): Achievements and prospects for forest tree germplasm. In: International Workshop on In vitro Conservation of Plant Genetic Resources. Universiti Kebangsaan Malaysia and International Plant Genetic Resources Institute, Kuala Lumpur, Malaysia, p. 20.
- ONAY, A., JEFFREE, C.E. & YEOMAN, M.M. (1996): Plant regeneration from encapsulated embryoids and an embryogenic mass of pistachio, *Pistacia vera* L. Plant Cell Reports, 15: 723-726.
- ONISHI, N., Y. SAKAMOTO & T. HIROSAWA (1994): Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 39: 137-145.
- OTSUKA, H., SUEMATSU, N. & TODA, M. (1985): The culture and plant regeneration from mesophyll protoplast of Chrysanthemum. Bull Shizuoka Agr. Exp. St., 30 : 25-33.
- PADMAJA, G. REDDY, L.R. & REDDY, G.M. (1995): Plant regeneration from synthetic seeds of groundnut, *Arachis hypogaea* L. Indian Journal of Experimental Biology, 33: 967-971.
- PATEL, A.V., PUSCH, I., MIX-WAGNER, G. & VORLOP, K.D. (2000): A novel encapsulation technique for the production of artificial seeds. Plant Cell Reports, 19: 868-874.
- PATTNAIK, S.K., SAHOO, Y. & CHAND, P.K. (1995): Efficient plant retrieval from alginate-encapsulated vegetative buds of mature mulberry trees. Scientia Horticulturae, 61: 227-239.
- PATTNAIK, S. & CHAND, P.K. (2000): Morphogenic response of the alginate-encapsulated buds from in vitro shoot cultures of six mulberries. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60: 177-185.
- PAULET, F., ENGELMANN, F. & GLASZMANN, J-C. (1993): Cryopreservation of apices of in vitro plantlets of sugarcane (*Saccharum spp.* hybrids) using encapsulation-dehydration. Cryolett., 12: 525-529.
- PAVINGEROVA, D., DOSTAI, J., BISKOVA, R. & BENETKA, V. (1994): Somatic embryogenesis and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. Plant Sci., 97: 95-101.

- PICCIONI, E. (1997): Plantlets from encapsulated micropropagated buds of M.26 apple rootstock. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47: 255-260.
- PICCIONI, E. & STANDARDI, A. (1995): Encapsulation of micropropagated buds of six woody species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42: 221-226.
- PICCIONI, E., STANDARDI, A. & TUTUIANU, V.C. (1996): Storage of M.26 apple rootstock encapsulated microcuttings. *Adv. Hort. Sci.*, 10: 185-190.
- PICCIONI, E., CAPUANO, G. & STANDARDI, A. (1997): Conversion of M.26 encapsulated microcuttings on perlite. 1997 Congress of In Vitro Biology, Washington DC, USA, Abstracts, P1027.
- PINKER, I. (2000): Characterization of stem quality in relation to rooting process in *Prunus*- and *Amelanchier*- cultures. *Acta Hort.* 530, S. 387-395.
- PINKER, I., JESCH, H.-H. und KLAUSCH, A. (1995): Bewurzelung und Akklimation in vitro vermehrter *Tilia cordata* 'Wega'-Sprosse. *Gartenbauwissenschaft*, 60 (6). S. 253-258.
- PLESSIS, P., LEDDET, C. & DEREUDDRE, J. (1991): Resistance to dehydration and freezing in liquid nitrogen of alginate coated shoot tips of grape vine (*Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay). *C. R. Acad. Sci., Paris Serie III.* 313: 373-381.
- PLESSIS, P., LEDDET, C., COLLAS, A. & DEREUDDRE, J. (1993): Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv. 'Chardonnay' shoot tips by encapsulation-dehydration: Effect of pretreatment, cooling and postculture conditions. *Cryo-lett.* 14: 309-320.
- POISSONNIER, M., MONOD, V., PAQUES, M. & DEREUDDRE, J. (1992): Cryopreservation in liquid nitrogen of *Eucalyptus gunnii* shoot tips grown in vitro following encapsulation and dehydration. *Annales de Recherches Sylvicoles, AFOCEL* 5-23.
- QUOIRIN, M. & LEPOIVRE, P. (1977): Etude de milieux adaptes aux cultures in vitro de *Prunus*. *Acta Hort.*, 78: 437-442.
- RAO, P.V.L. & SINGH, B. (1991): Plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of hybrid *Solanum molengena* L. *Plant Cell Rep.*, 10: 7-11.

- REDENBAUGH, K. (1993): Introduction. In: Redenbaugh, K. (ed) synseeds: applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement (pp. 3-7). CRC Press, Inc., Boca Raton, Ca., USA.
- REDENBAUGH, K., FUJII, J.A. & SLADE, D. (1988): Encapsulated plant embryos. In: Mizrahi A. (ed.) Biotechnology in Agriculture. Advances in Biotechnology Processes, 9: 225-248. Alan R. Liss, Inc., New York.
- REDENBAUGH, K., FUJII, J., D. SLADE, P. VISS & M. KOSSLER (1991): Artificial seeds—encapsulated somatic embryos. In: Biotechnology I Agriculture and Forestry, Vol. 17 (ed. Y.P.S. Bajaj), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg; S. 395-415.
- REDENBAUGH, K., VISS, P., SLADE, D. & FUJII, J. (1987): Scale-up: artificial seeds. In: Green C, Somers D, Hackett W, Biesboer D (eds). Plant Tissue and Cell Culture. Alan Liss, New York, pp. 473-493.
- REDENBAUGH, K., FUJII, J. A. & SLADE, D. (1993): Hydrated coatings for synthetic seeds. In: K. Redenbaugh (ed.), Synseeds, pp. 35-46. CRC Press, Boca Raton.
- REPUNTE, V.P., TAYA, M. & TONE, S. (1996): Conservation of root regeneration potential of cell aggregates from horseradish hairy roots used as artificial seeds. Journal of Chemical Engineering of Japan, 29: 874-880.
- REUVENI, O. & ADATO, I. (1974): Endogenous carbohydrates, root promoters and root inhibitors in easy and difficult-to-root Date Palm (*Phoenix dactylifera*, L.) offshoots. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 99 (4): 361-363.
- ROEST, S. & BOKELMANN, G.S. (1975): Vegetative propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ram. in vitro. Sci. Hort., 3: 317-330.
- ROUT, G.R. & DAS, P. (1997): Recent trends in the biotechnology of *Chrysanthemum*: a critical review. Scientia Horticulturae, 69: 239-257.
- SAJINA, A., MINOO, D., GEETHA, S.P., SAMSUDEEN, K., REMA, J., NIRMALBABU, K. & RAVINDRAN, P.N. (1997): Production of synthetic seeds in few spice crops. Biotechnology of Spices, Medicinal & Aromatic Plants, S. 65-69.

- SAKAI, A. (1995): Cryopreservation for germplasm collection in woody plants. In: Jain, S., Gupta, P. & Newton, R. (eds.) Somatic Embryogenesis in Woody Plants, vol. 1. Kluwer, Dordrecht, pp. 293-315.
- SAKAI, A., MATSUMOTO, T., HIRAI, D. & NIINO, T. (2000): Newly developed encapsulation-dehydration protocol for plant cryopreservation. *Cryo-lett.*, 21: 53-62.
- SAKAMOTO, Y., MASHIKO, T., SUZUKI, A. & KAWATA, H. (1992): Development of encapsulation technology for synthetic seeds. *Acta Horticulturae*, 319: 71-76.
- SAKAMOTO, Y., ONISHI, N. & HIROSAWA, T. (1995): Delivery systems for tissue culture by encapsulation. In: Automation and Environmental control in plant tissue culture (eds. J. Aitken-Chrsity, T. Kozai, L. Smith); Kluwer Acad. Publishers, S. 215-243.
- SANADA, M., SAKAMOTO, Y., HAYASHI, M., MASHIKO, T., OKAMOTO, A. & ONISHI, N. (1993): Celery and lettuce. In K. REDENBAUGH (ed.), *Synseeds*, pp. 305-327. CRC Press, Boca Raton.
- SANTARIUS, K.A. (1973): The protective effect of sugars on chloroplast membranes during temperature and water stress and its relationship to frost, desiccation and heat resistance. *Planta*, 113: 105-114.
- SARKAR, D. & NAIK, P.S. (1998): Synseeds in potato: an investigation using nutrient-encapsulated in vitro nodal segments. *Scientia Horticulturae*, 73: 179-184.
- SCHÄFER-MENUHR, A.(1995): Refinement of Cryopreservation Techniques for Potato, Project Progress Report. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, (DSMZ), Institut für Pflanzenbau Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Germany.
- SCHUM, A. & PREIL, W. (1981): Regeneration von Kallus aus Mesophyll-Protoplasten von *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Gartenbauwissenschaft*, 46(2): 91-93.
- SCOTTEZ, C. (1993): Cryoconservation après encapsulation-déshydratation d'apex de poirier (*Pyrus communis* L. cv. Beurre Hardy) cultivé in vitro: Effets d'un endurcissement par les basses températures et étude du métabolisme des lipides. Thèse d'Université, Université Paris 6.
- SCOTTEZ, C., CHEVREAU, E., GODARD, N., ARNAUD, Y., DURON, M. & DEREUDDRE, J. (1992): Cryopreservation of cold acclimated shoot tips of pear in vitro cultures after encapsulation-dehydration. *Cryobiology*, 29: 691-700.

- SCOWCROFT, W.R. (1984): Genetic Variability in Tissue Culture: Impact on Germplasm Conservation and Utilization. IBPGR. Rome.
- SCOWCROFT, W.R. & LARKIN, P.J. (1988): Somaclonal variation. In: Block G. and Marsh J. (eds.) Application of Plant Cell and Tissue Culture. Ciba Foundation Symposium, 137: 21-35. Chichester: Wiley.
- SHARMA, T.R., SINGH, B.M. & CHAUHAN, R.S. (1994): Production of disease-free encapsulated buds of *Zingiber officinale* Rosc. Plant Cell Reports, 13: 300-302.
- SHIBLI, R.A. (2000): Cryopreservation of black iris (*Iris nigricans*) somatic embryos by encapsulation-dehydration. Cryo-Letter, 21: 39-46.
- SHIBLI, R.A., SMITH, M.A.L. & SHATNAWI, M. (1999): Pigment recovery from encapsulated-dehydrated *Vaccinium pahalae* cryopreserved cells. Plant Cell Tissue Organ Culture, 55: 119-123.
- SHIGETA, J., MORI, T. & SATO, K. (1993): Storage of encapsulated somatic embryos of carrot. Biotechnology Techniques, 7(3): 165-168.
- SHINOYAMA, H., NOMURA, Y., TUCHIYA, T. & KAZUMA, T. (1997): Direct embryoid formation and plant regeneration from leaves of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) (in Japanese). Jpn. J. Breed, 46[Suppl]: 158.
- SHORT, K.C. & A.W. ROBERTS (1991): Rosa sp. (Roses): In vitro culture, micropropagation, and the production of secondary products. In Bajaj, Y.P.S. (ed.) Biotechnology in agriculture and forestry 15, Medicinal and aromatic plants III, 376-397. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- SICURANI, M., PICCIONI, E. & STANDARDI, A. (2001): Micropropagation and preparation of synthetic seed in M.26 apple rootstock I: Attempts towards saving labor in the production of adventitious shoot tips suitable for encapsulation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 66: 207-216.
- SKIRVIN, R.M., M.C. CHU & H. YOUNG (1990): Rose. In: P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp und Y.P.S. Bajaj (eds.) Handbook on plant cell culture 5, Ornamental species, 716-743. McGraw-Hill, New York.

- SORENG, R.J. & COPE, E.A. (1991): On the taxonomy of cultivated species of the *Chrysanthemum* genus-complex. Bailey, 23: 145-165. In HORN Zierpflanzenbau (1996), Zierpflanzenbau Handbuch, Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin, Wien, 503-518.
- STANDARDI, A. & PICCIONI, E. (1996): Rooting induction in encapsulated buds of M. 26 apple rootstock for synthetic seed. second International symposium on the Biology of Root formation and development. Jerusalem, Israel, Abstracts, 10.
- STEPONKUS, P.L., LANGIS, R. & FUJIKAWA, S. (1992): Cryopreservation of plant tissues by vitrification. In: Steponkus, P. L. (ed.) Advances in low Temperature Biology. JAI press, Hampton Hill, UK.
- STOLTZ, L.P. (1967): Factors influencing root initiation in an-easy- and a difficult to root chrysanthemum. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 92: 622-626.
- SUTTER, E. & LANGHANS, R.W. (1981): Abnormalities in *Chrysanthemum* regenerated from long term cultures. Ann. Bot., 40: 559-568.
- SUZUKI, M., ISHIKAWA, M. & AKIHAMA, T. (1998): A novel preculture method for the induction of desiccation tolerance in gentian axillary buds for cryopreservation. Plant Sci., 135: 69-76.
- SWAN, T.W., O'HARE, D., GILL, R.A. & LYNCH, P.T. (1999): Influence of preculture conditions on the post-thaw recovery of suspension cultures of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). Cryo-Letter, 20: 325-336.
- TANAKA, K., KANNO, Y., KUDO, S. & SUZUKI, M. (2000): Somatic embryogenesis and plant regeneration in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura). Plant Cell Reports, 19: 946-953.
- TANNOURY, M. (1993): Cryoconservation d'apex d'Oeillet (*Dianthus caryophyllus* L.) et d'embryons somatiques de Carotte (*Daucus carota* L.) par les procédés d'enrobage-déshydratation et d'enrobage-vitrification. PhD Thesis, Université Paris VI.
- URAGAMI, A., SAKAI, A. & NAGAI, M. (1990): Cryopreservation of dried axillary buds from plantlet of *Asparagus officinalis* L. grown in vitro. Plant Cell Reports, 9: 328-331.

- VANDENBUSSCHE, B., DEMEULEMEESTER, M.A.C. & DE PROFT, M.P. (1993): Cryopreservation of alginate-coated in vitro grown shoot tips of chicory (*Cichorium intybus* L.) using rapid freezing. *Cryo-lett*, 14: 259-266.
- VAN TELGEN, H.J., ELAGÖZ, V., VAN MILL, A., PAFFEN, A. & DE KLERK, G.J. (1992): Role of plant hormones in lateral bud growth of rose and apple in vitro. *Acta Horticulturae*, 319: 137-142.
- VOGELMANN, A. (1969): *Chrysanthemen* 2. Aufl. Stuttgart: Ulmer.
- WANG, Q., TANNE, E., ARAV, A. & GAFNY, R. (2000): Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63:41-46.
- WITHERS, L.A. (1987): Long-term preservation of plant cells, tissues and organs. *Oxford Survey Plant Molec. Cell. Biol.*, 4: 221-272.
- WITHERS, L.A. & ENGELMANN, F. (1998): In vitro conservation of plant genetic resources. In: Altman, A. (ed.) *Agricultural Biotechnology*, pp. 57-88, Marcel Dekker, New York.
- WU, Y., ENGELMANN, F., ZHAO, Y., ZHOU, M. & CHEN, S. (1999): Cryopreservation of apple shoot tips: Importance of cryopreservation technique and of conditioning of donor plants. *Cryo-lett*. 20: 121-130.
- WYLIE, A.P. (1954): The history of garden roses. *J. Roy. Hortic. Soc.*, 79: 555-571 und 80: 8-24, 27-87.
- YOSHIDA, T. (1996): *In vitro* Propagation of Hybrid Rice (*Oryza sativa* L.). 1. "Tissue-cultured" shoot primordia. *JARQ* 30: 1-8.
- YUEHUA, C. & WENMING, L. (1994): Study on the conservation of *Eucalyptus* germplasm encapsulated in alginate beads at room temperature. I. Studies on the condition of conservation. Abstract Collection of IUFRO Workshop Asia-Pacific Symposium on Forest Genetic Improvement, Beijing, China, pp. 91-92.

ZHAO, Y., WU, Y., ENGELMANN, F., ZHOU, M., ZHANG, D. & CHEN, S. (1999):
Cryopreservation of apple shoot tips by encapsulation-dehydration: Effect of reculture,
dehydration and freezing procedure on shoot regeneration. *Cryo-lett.* 20: 103-108.

ZVG-Report 27 (2001), S. 60.

Verzeichnis der Tabellen

	Seite
Tab. (1): Anwendungsfelder für künstliche Samen (FUJII <i>et al.</i> , 1987).	3
Tab. (2): Einteilung der wichtigsten „ <i>Chrysanthemum</i> “-Arten (SORENG & COPE, 1991 in HORN, 1996).	4
Tab. (3): Einfluss der Explantatlänge auf die Lagerfähigkeit und Konversion der künstlichen Samen.	12
Tab. (4): Gele für die Einkapselung somatischer Embryonen (REDENBAUGH <i>et al.</i> , 1987).	14
Tab. (5): Einfluss der Na-Alginatkonzentration auf die Herstellung und Konversion der künstlichen Samen.	16
Tab. (6): Einfluss der Konzentration der Härterlösung auf die Herstellung der künstlichen Samen.	16
Tab. (7a): Einfluss der Gelmatrixkomponenten (Nährsalze und Zucker) auf die Konversion der künstlichen Samen.	19
Tab. (7b): Einfluss der Wachstumsregulatoren auf die Konversion der künstlichen Samen.	20
Tab. (8): Einfluss der Methoden der Einkapselung auf die Konversion der künstlichen Samen.	23
Tab. (9): Der Zusatz von Antibiotika und/oder Fungiziden zur Gelmatrix für die Verbesserung der Konversion der künstlichen Samen unter unsterilen Bedingungen.	26
Tab. (10): Lagerung der künstlichen Samen bei niedrigen Temperaturen über 0°C.	28
Tab. (11): Varianten zur Prüfung der Wirkung der Einkapselungsmethoden auf die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> 'PS 27'.	47
Tab. (12): Varianten zur Untersuchung von IES und BAP auf die Konversion der künstlichen Samen von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> 'PS 27'.	48
Tab. (13): Varianten zur Prüfung von Wachstumsregulatoren auf die Konversion der künstlichen Samen von <i>Rosa hybrida</i> 'Kardinal'.	49
Tab. (14): Varianten zur Untersuchung von IBS und NES auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von <i>Rosa hybrida</i> 'Kardinal'.	50
Tab. (15): Varianten zur Prüfung der Saccharosekonzentration auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von <i>Rosa hybrida</i> 'Kardinal'. Einfluss von IBS und NES.	50
Tab. (16): Varianten zur Untersuchung der Kapselgröße auf die Spross- und Wurzelbildung von <i>Rosa hybrida</i> 'Kardinal'.	51

Tab. (17): Varianten zur Untersuchung der Wirkung von Gelmatrixkomponenten (Saccharose und Hormone) auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von <i>Rosa hybrida</i> 'Kardinal'.	51
Tab. (18): Entwicklung der Samenschale unter sterilen Bedingungen.	52
Tab. (19): Lagerung der künstlichen Samen von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> 'PS 27' in verschiedenen Lagerungslösungen unter 4°C.	54
Tab. (20): Varianten zur Untersuchung der Wirkung der progressiven Zunahme der Saccharosekonzentration (Vorbehandlung) auf den Wassergehalt und die Sprossbildung der eingekapselten Nodiensegmente von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> 'PS 27'.	55
Tab. (21): Einfluss der Position der Explantate am Spross auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von <i>Rosa hybrida</i> 'Kardinal' nach 7 Wochen Kulturdauer auf einem Agar-Wasser-Medium.	59
Tab. (22): Einfluss der Inkubationsdauer der Kugeln auf einem Agar-Wasser-Medium auf die NO ₃ -Verluste.	64
Tab. (23): Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Vitalität und Sprossbildung der künstlichen Samen von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> 'PS 27' nach 1 Woche, 3 und 4 Monaten in einer MS + 1,0 mg/l IES-Lösung während der Lagerung und 8 Wochen nach Überführung in Zimmertemperatur (ZTemp.) auf einem Agar-Wasser-Medium.	86
Tab. (24): Einfluss des Lagermediums bei 4°C auf die Vitalität der eingekapselten Nodiensegmente von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> 'PS 27'.	87
Tab. (25): Einfluss der Saccharosekonzentration bei der Vorbehandlung und der Trocknung in der Laminarbox auf die Sprossbildung der eingekapselten Nodiensegmente von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> 'PS 27' auf einem MS-Medium nach 8 Wochen Kulturdauer.	89
Tab. (26): Einfluss der Saccharosekonzentration auf den Wassergehalt der Nodiensegmente von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> 'PS 27'.	90
Tab. (27): Einfluss der Saccharosekonzentration auf den Wassergehalt der Nodiensegmente von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> 'PS 27' nach der Dehydrierung der k. S. in der Laminarbox für 7h.	90
Tab. (28): Einfluss der Dehydrierungsdauer der k. S. in der Laminarbox auf den Wassergehalt der Kugeln von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> 'PS 27'.	91

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Vergleich des Aufbaus natürlicher und künstlicher Samen. Es wäre sinnvoll eine Zwei-Schicht-Kapsel für die Produktion künstlicher Samen zu verwenden.	2
Abb. (2): <i>Dendranthema x grandiflorum</i> -Sorten	39
Abb. (3): <i>Rosa hybrida</i> 'Kardinal'	39
Abb. (4): Die Einkapselungsmethode.	41
Abb. 5: Einkapselte Nodiensegmente von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> .	41
Abb. (6): Einfluss der Subkulturdauer auf die Spross- und Wurzelbildung der Nodiensegmente von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> 'PS 27' auf einem hormonfreien MS-Medium	56
Abb. (7): Einfluss der ursprünglichen Position der Explantate am Spross auf die Spross- und Wurzelbildung der Nodiensegmente von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> 'PS 27' auf einem hormonfreien MS-Medium (1 = Sprossspitze, 2 – 5 = Nodiensegmente in basaler Richtung).	57
Abb. (8): Einfluss des Konversionssubstrates auf die Spross- und Wurzelbildung von eingekapselten Nodiensegmenten von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> 'PS 27' bei Einsatz von 2% Na-Alginat mit destilliertem Wasser als Gelmatrix nach 5 Wochen Kulturdauer.	59
Abb. (9): Einfluss der Na-Alginatkonzentration auf die Sprossbildung von eingekapselten Nodiensegmenten von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> 'PS 27' bei Einsatz von MS + 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBS als Konversionssubstrat.	60
Abb. (10): Einfluss der Gelmatrixkomponenten (MS-Salze und Zucker) auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium nach 5 Wochen Kulturdauer.	61
Abb. (11): Einfluss der Methoden der Einkapselung auf die Sprossbildung der eingekapselten Nodiensegmente von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium.	62
Abb. (12): Einfluss von Auxin und Cytokinin auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> 'PS 27' bei Einsatz von Agar mit destilliertem Wasser als Konversionssubstrat.	65
Abb. (13): Wachstum und Entwicklung der k. S. von <i>Dendranthema x grandiflorum</i> 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium bei Zusatz von MS + 1,0 mg/l IES zur Gelmatrix und zur Härterlösung und die Wäsche mit den gleichen Komponenten.	66

- Abb. (14): Einfluss der Gelmatrixkomponenten auf die Konversion der künstlichen Samen von *Dendranthema*-Sorten bei Einsatz von Agar mit destilliertem Wasser als Konversionssubstrat. 67
- Abb. (15): Spross- und Wurzelbildung bei *Rosa hybrida* 'Kardinal', beeinflusst durch die Zugabe verschiedener Wachstumsregulatoren. 68
- Abb. (16): Spross- und Wurzelbildung eingekapselter Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal' unter Einfluss von IBS und NES bei Einsatz von Agar mit destilliertem Wasser als Konversionssubstrat. 69
- Abb. (17): Einfluss der Saccharosekonzentrationen mit MS + 1 mg/l IBS als Gelmatrix auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal' bei Einsatz von Agar + Wasser als Konversionssubstrat. 70
- Abb. (18): Konversion der künstlichen Samen von *Rosa hybrida* 'Kardinal' auf einem Agar-Wasser-Medium bei Einsatz von 3% Alginat + MS + 90 g/l Saccharose + 1 mg/l IBS als Gelmatrix nach 7 Wochen Kulturdauer. 71
- Abb. (19): Einfluss der Kapselgröße auf die Spross- und Wurzelbildung von Rose 'Kardinal'. 72
- Abb. (20): Spross- und Wurzelbildung der k. S. von Rose 'Kardinal' auf einem Agar-Wasser-Medium bei Verwendung von 3 Wochen altem Pflanzenmaterial nach 7 Wochen Kulturdauer. 73
- Abb. (21): Einfluss der Gelmatrixkomponenten beim Aufgießen von MS-Medium auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal' auf einem Agar-Wasser-Medium nach 9 Wochen Kulturdauer. 73
- Abb. (22): Entwicklung der Pflanzen aus künstlichen Samen von *Rosa hybrida* 'Kardinal' unter dem Einfluss von 2 mg/l IBS und 90 g/l Saccharose mit Aufgießen von MS-Medium nach 7 Wochen Wachstum nach 9 Wochen Kulturdauer. 74
- Abb. (23): Wachstum und Entwicklung der künstlichen Samen von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf verschiedenen Substraten unter sterilen Bedingungen. 75
- Abb. (24): Einfluss des Substrates auf die Spross- und Wurzelbildung der künstlichen Samen von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' bei Einsatz von MS + 1,0 mg/l IES als Gelmatrix. 76
- Abb. (25): Konversion der künstlichen Samen von *Dendranthema*-Sorten auf Sand mit destilliertem Wasser als Konversionssubstrat unter sterilen Bedingungen. 76

- Abb. (26): Konversion von *Dendranthema*-Sorten auf einem Sand-Wasser-Substrat unter sterilen Bedingungen. 77
- Abb. (27): Einfluss einer zweiten Kapselschicht auf die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' bei Einsatz von Agar mit destilliertem Wasser als Konversionssubstrat nach 8 Wochen Kulturdauer. 77
- Abb. (28): Wachstum und Entwicklung der k. S. von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium bei Einsatz einer Zwei-Schicht-Samenschale. 78
- Abb. (29): Einfluss der zweiten Kapselschicht auf die Kontamination und Entwicklung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' unter unsterilen Bedingungen. 79
- Abb. (30): Einfluss der Samenschale auf die Bewurzelung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Perlit-Wasser-Substrat unter unsterilen Bedingungen. 80
- Abb. (31): Keimung und Entwicklung der künstlichen Samen von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Perlit-Wasser-Substrat unter unsterilen Bedingungen bei Verwendung einer Zwei-Schicht-Samenschale. 81
- Abb. (32): Keimung und Entwicklung der eingekapselten Gewächshausnodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium bei Einsatz von MS + 4 mg/l IES als Gelmatrix. 82
- Abb. (33): Einfluss der IES-Konzentration in der Gelmatrix auf die Spross- und Wurzelbildung eingekapselter Nodiensegmente aus dem Gewächshaus von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium. 83
- Abb. (34): Spross- und Wurzelbildung eingekapselter Nodiensegmente verschiedener *Dendranthema*-Sorten aus dem Gewächshaus auf einem Agar-Wasser-Medium bei Zusatz von MS + 4 mg/l IES zur Gelmatrix. 84
- Abb. (35): Einfluss des Lagermediums bei 4°C für 3 Monate auf die Sprossbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium nach 8 Wochen Kulturdauer. 87
- Abb. (36): Keimung und Entwicklung der k. S. von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium nach der Lagerung für 3 Monate in verschiedenen Lagerlösungen (von links nach rechts: Paraffin, MS + 1 mg/l IES, MS + 1 mg/l IES + 0,5 M Mannitol und MS + 1 mg/l IES + 1 M Mannitol) bei 4°C. 87

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHER STATUS

Name	Sayed Shehata Abdin Abdel-Rahman
Geburtsort	Sahel Saleem, Assiut, Ägypten
Geburtsdatum	24.05.1966
Staatsangehörigkeit	Ägypten
Familienstatus	verheiratet
Postanschrift	Assiut University, Faculty of Agriculture, Floriculture Department, Assiut, Egypt
Gegenwärtiger Beruf	Oberassistent an der Landwirtschaftlichen Fakultät, Assiut Universität, Assiut, Ägypten

AKADEMISCHE QUALIFIKATIONEN

1973-1978	Grundschule: Assiut, Ägypten
1978-1981	Mittelschule: Assiut, Ägypten
1981-1984	Abitur: Assiut, Ägypten
1984-1988	Bachelor Agrarwissenschaften (B.Sc.), Zierpflanzenbau, Landwirtschaftliche Fakultät, Assiut Universität, Ägypten
1988-1991	Militärischer Dienst
1991-1995	Magister Agrarwissenschaften (M.Sc.), Zierpflanzenbau, Landwirtschaftliche Fakultät, Assiut Universität, Ägypten
1995-1997	Oberassistent an der Landwirtschaftlichen Fakultät (Zierpflanzenbau), Assiut Universität, Ägypten
1998-2003	Doktorand am Fachgebiet Zierpflanzenbau des Instituts für Gartenbauwissenschaften, Humboldt-Universität zu Berlin

Veröffentlichte wissenschaftliche Schriften und Vorträge

- 1) ABDIN, S. S. (1995): Effect of nutritional and hormonal status of mother plants on propagation of some *Ficus* species. M.Sc. Thesis, Horticulture (Floriculture), Horticulture Department, Faculty of Agriculture, Assiut University, Assiut, Egypt.
- 2) BARHAM, I.H., EL-KELTAWI, N.E. and ABDIN, S.S. (1998): Effect of nitrogen nutrition of mother plants on propagation of two *Ficus* species. The Second Conference of ornamental Horticulture, Ismailia, Egypt, 24-26 October 1998.
- 3) BARHAM, I.H., EL-KELTAWI, N.E. and ABDIN, S.S. (2000): The role of zinc element in propagation of two *Ficus* species by cuttings. The Second Scientific Conference of Agricultural Sciences, Assiut, Egypt, 28-29 October 2000. Vol. (1): 371-381.
- 4) BARHAM, I.H., EL-KELTAWI, N.E. and ABDIN, S.S. (2000): Rootability of two *Ficus* species as affected by 3-Indol Butyric Acid treatment. The 2 nd. Scientific Conference of Agricultural Sciences, Assiut, Egypt, 28-29 October 2000. Vol. (1): 383-396.
- 5) ABDEL-RAHMAN, S., PINKER, I. & KAUFMANN, H-G. (2000): Einkapselung von Chrysanthemen-Nodiensegmenten-Erste Ergebnisse. Poster September (Arbeitskreis Deutsche in vitro-Kulturen, Wien).
- 6) ABDEL-RAHMAN, S. (2001): Doktorandenseminar (31.01.2001) „Untersuchungen zur Einkapselung von Chrysanthemen-Nodiensegmenten-Erste Ergebnisse“.
- 7) PINKER, I. & ABDEL-RAHMAN, S. (2001): Artificial seeds. Workshop University of Agriculture and Forestry Hue, Vietnam (März 2001).
- 8) PINKER, I., ABDEL-RAHMAN, S. & LÜDTKE, G. (2001): Einkapselung von Sprosssegmenten bei Chrysanthemen und Rosen. ADIVK-Tagung Berlin, ADIVK Aktuell Nr. 3, S. 19.
- 9) ABDEL-RAHMAN, S. (2001): Doktorandenseminar „Langzeitlagerung und Kryokonservierung künstlicher Samen“.
- 10) PINKER, I., ABDEL-RAHMAN, S. & LÜDTKE, G. (2002): Entwicklung künstlicher Samen durch Einkapselung von Nodiensegmenten von Chrysanthemen und Rosen. 39. Gartenbauwissenschaftliche Tagung (Braunschweig, März 2002). BDGL-Schriftenreihe Band 20, S. 116.

Danksagung

Herrn Prof. em. Dr. sc. H.-G. Kaufmann, Professor für Zierpflanzenbau, Fachgebiet Zierpflanzenbau, Institut für Gartenbauwissenschaften, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Humboldt-Universität zu Berlin, danke ich für seine Ermutigung, wertvollen Rat, freundliche Unterstützung und Betreuung.

Frau Dr. I. Pinker, Leiterin der Pflanzlichen Zell- und Gewebekultur, Institut für Gartenbauwissenschaften, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Humboldt-Universität zu Berlin, danke ich nicht nur für ihre gewissenhafte Aufsicht, sondern auch für ihren hilfreichen Rat, wertvolle Vorschläge, dauernde Ermutigung und für die Möglichkeit die Untersuchungen in der Arbeitsgruppe „Pflanzliche Zell- und Gewebekultur“ durchzuführen zu können.

Den Mitarbeiterinnen der Pflanzlichen Zell- und Gewebekultur möchte ich für die Hilfe bei den Laborarbeiten danken. Gleichzeitig sage ich Frau G. Lüdtko Dank für ihre Hilfe und Ermutigung.

Mein Dank gilt der Firma Brandkamp, die mir 10 Chrysanthemen-Sorten zur Verfügung gestellt hat.

Für die Übernahme in das ägyptische Stipendienprogramm von 1998-2002 möchte ich mich bedanken.

Mein Dank gilt auch dem akademischen Auslandsamt der Humboldt-Universität für die zusätzliche finanzielle Unterstützung im „Matching-Funds-Stipendium“ von September 2002 bis Mai 2003.

Weiterhin danke ich meinen Eltern, meiner Frau und meinen Kindern für ihre Ermutigung und freundliche Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Die Dissertation ist das Ergebnis einer wissenschaftlichen Untersuchung, welche von Juli 1998 bis Juni 2002 im Labor von Dr. I. Pinker im Fachgebiet „Pflanzliche Zell- und Gewebekultur“ im Institut für Gartenbauwissenschaften der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt wurde. Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, April 2003

Sayed Shehata Abdin Abdel-Rahman

Tabellenanhang

Tab. (1): Einfluss der Subkulturdauer auf die Spross- und Wurzelbildung der Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem hormonfreien MS-Medium.

Subkulturdauer (Wo.)	Sprossbildung %			Wurzelbildung % nach 5 Wo.
	nach			
	1 Wo.	3 Wo.	5 Wo.	
5	68,3	93,3	100,0	85,0
6	53,3	78,3	96,7	76,7
7	48,3	73,3	95,0	43,3
8	43,3	68,3	93,3	43,3

Tab. (2): Einfluss der ursprünglichen Position der Explantate am Spross auf die Spross- und Wurzelbildung der Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem hormonfreien MS-Medium (1 = Sprossspitze, 2 – 5 = Nodiensegmente in basaler Richtung).

Position der Explantate am Spross	Sprossbildung %			Wurzelbildung % nach 5 Wo.
	nach			
	1 Wo.	3 Wo.	5 Wo.	
1	91,7	100,0	100,0	91,7
2	30,0	90,3	98,3	60,0
3	30,0	88,3	98,3	63,3
4	30,0	91,7	98,3	56,7
5	31,7	93,3	98,3	53,3

Tab. (3): Einfluss des Konversionssubstrates auf die Spross- und Wurzelbildung von eingekapselten Nodiensegmenten von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' bei Einsatz von 2% Na-Alginat mit destilliertem Wasser als Gelmatrix nach 5 Wochen Kulturdauer.

Konversionssubstrat	Sprossbildung %	Wurzelbildung %
Agar +Wasser	33,3	08,0
Agar + MS	66,7	50,0
Perlit + Wasser	10,0	00,0
Perlit + MS	93,3	50,0

Tab. (4): Einfluss der Na-Alginatkonzentration auf die Spross- und Wurzelbildung von eingekapselten Nodiensegmenten von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' bei Einsatz von MS + 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBS als Konversionssubstrat.

Na- Alginatekonzentrationen (%)	Sprossbildung %		Wurzelbildung % nach 5 Wo.
	nach		
	3 Wo.	5 Wo.	
1,5	50,0	65,0	12,8
2,0	42,6	63,0	08,8
2,5	44,4	63,0	08,8
3,0	66,7	81,7	08,7
3,5	33,3	46,7	16,1
4,0	31,7	45,0	10,3

Tab. (5): Einfluss der Gelmatrixkomponenten (MS-Salze und Zucker) auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium nach 5 Wochen Kulturdauer.

Gelmatrixkomponenten	Sprossbildung %	Wurzelbildung %
Wasser	21,7	10,0
Wasser + Sacc.	27,6	15,4
0,5 MS + Vit.	55,9	06,1
0,5 MS + Vit. + Sacc.	63,3	02,6
MS + Vit.	58,2	00,0
MS + Vit. + Sacc.	84,7	18,0

Tab. (6): Einfluss der Methoden der Einkapselung auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium.

Methoden der Einkapselung			Sprossbildung %			Bewurzelun
Gelmatrix (3% Na-Alginat)	Härterlösung	Wäsche	nach			g %
			1 Wo.	3 Wo.	5 Wo.	nach 5 Wo.
MS + Vit. + Sacc.	Wasser	Wasser	06,7	55,0	78,3	2,1
MS + Vit. + Sacc.	Wasser	MS + Vit. + Sacc.	11,7	66,7	96,7	5,2
Wasser	Ca-freies MS	-----	16,7	71,7	96,7	22,8
MS + Vit. + Sacc.	MS + Vit. + Sacc.	-----	30,0	93,3	98,3	23,7

Tab. Einfluss von Auxin und Cytokinin auf die Spross- und Wurzelbildung der
(7): eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' bei
Einsatz von Agar mit destilliertem Wasser als Konversionssubstrat.

Gelmatrixkomponenten (3% Na-Alginat)	Sprossbildung %				Wurzelbildung %		
	nach				nach		
	1Wo.	3 Wo.	5 Wo.	8 Wo.	3 Wo.	5 Wo.	8 Wo.
Knospen ohne Gel auf einem MS-Medium.	75,0	95,0	95,0	100,0	21,7	75,0	100,0
volles MS	13,3	96,7	100,0	100,0	05,0	21,7	70,0
volles MS + 0,01 mg/l IES	16,7	98,3	100,0	100,0	05,0	28,3	70,0
volles MS + 0,02 mg/l IES	11,7	93,3	100,0	100,0	03,0	23,3	71,7
volles MS + 0,05 mg/l IES	13,3	95,0	100,0	100,0	06,7	26,7	71,7
volles MS + 0,10 mg/l IES	15,0	93,3	100,0	100,0	11,7	30,0	78,3
volles MS + 0,20 mg/l IES	13,3	90,0	96,7	100,0	26,7	46,7	85,0
volles MS + 0,50 mg/l IES	11,7	83,3	98,3	100,0	31,7	53,3	85,0
volles MS + 1,00 mg/l IES	08,3	58,3	96,7	100,0	76,7	91,7	100,0
volles MS + 0,20 mg/l BAP	11,7	98,3	100,0	100,0	00,0	00,0	55,0
volles MS + 0,20 mg/l BAP + 0,01 mg/l IES	13,3	96,7	100,0	100,	00,0	00,0	70,0

Tab. (8): Einfluss der Gelmatrixkomponenten auf die Konversion der künstlichen Samen von *Dendranthema*-Sorten bei Einsatz von Agar mit destilliertem Wasser als Konversionssubstrat.

Gelmatrixkomponenten (3% Alginat + MS + Hormon „mg/l“)	<i>Dendranthema</i> -Sorten	Sprossbildung %		Bewurzelung %
		nach		nach
		5 Wo.	8 Wo.	8 Wo.
1,0 IES	‘PS 27’	98,3	100,0	100,0
	‘Snowdon Weiß’	98,3	100,0	98,3
	‘Topfweiß’	93,3	100,0	98,3
	‘Garden mum’	98,3	100,0	100,0
1,0 IES + 0,5 GA ₃	‘PS 27’	90,0	100,0	98,3
	‘Snowdon Weiß’	93,3	100,0	91,7
	‘Topfweiß’	83,3	98,3	91,7
	‘Garden mum’	96,7	100,0	98,3
1,0 IES + 0,2 BAP	‘PS 27’	73,3	100,0	60,0
	‘Snowdon Weiß’	79,7	100,0	33,3
	‘Topfweiß’	75,0	98,3	38,3
	‘Garden mum’	80,0	98,3	81,7

Tab. (9): Spross- und Wurzelbildung bei *Rosa hybrida* 'Kardinal' beeinflusst, durch die Zugabe verschiedener Wachstumsregulatoren nach 7 Wochen Kulturdauer.

Variante	Gelmatrixkomponenten (3% Na-Alginat + volles MS + Hormon „mg/l“)	Sprossbildung %	Wurzelbildung %
1	0,25 BAP + 0,5 GA ₃	61,1	0,0
2	0,5 BAP + 0,5 GA ₃	73,3	2,2
3	0,2 IBS	67,8	1,1
4	0,5 IBS	43,3	1,1
5	0,5 BAP + 0,2 IBS	76,7	0,0

Tab. (10): Spross- und Wurzelbildung eingekapselter Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal' unter Einfluss von IBS und NES bei Einsatz von Agar mit destilliertem Wasser als Konversionssubstrat.

Variante	Gelmatrixkomponenten (3% Na-Alginat + volles MS + Hormon „mg/l“)	Sprossbildung %	Wurzelbildung %
1	2 IBS	20,0	35,0
2	1,5 IBS + 0,3 NES	23,3	51,7
3	1,5 IBS + 0,2 NES	16,7	40,0
4	0,5 IBS + 0,4 NES	31,7	35,0
5	0,5 NES	58,3	15,0

Tab. Einfluss der Saccharosekonzentrationen mit MS + 1 mg/l IBS als Gelmatrix auf
(11): die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal' bei Einsatz von Agar + Wasser als Konversionssubstrat.

Variante	Saccharose (g/l)	Sprossbildung %	Wurzelbildung %
1	10	10	0,0
2	20	50	0,0
3	30	63,3	3,3
4	40	66,7	13,3
5	50	73,3	30,0
6	60	53,3	33,3
7	70	66,7	43,3
8	80	80	56,7
9	90	83,3	53,3

Tab. (12): Einfluss der Kapselgröße auf die Spross- und Wurzelbildung von Rose 'Kardinal'.

Variante	Kapselgröße	Sprossbildung %	Wurzelbildung %
1	0,075 ml MS + 2 mg/l IBS	63,3	40,0
2	0,085 ml MS + 2 mg/l IBS	46,7	46,7
3	0,075 ml MS + 0,5 mg/l IBS + 0,4 mg/l NES	53,3	33,3
4	0,085 ml MS + 0,5 mg/l IBS + 0,4 mg/l NES	56,7	46,7

Tab. (13): Spross- und Wurzelbildung der k. S. von Rose 'Kardinal' auf einem Agar-Wasser-Medium bei Verwendung von 3 Wochen altem Pflanzenmaterial nach 7 Wochen Kulturdauer.

Variante	Gelmatrixkomponenten (3% Na-Alginat)	Sprossbildung %	Wurzelbildung %
1	MS + Vit. + 80 g/l Sacc. + 2 mg/l IBS	58,3	75,0
2	MS + Vit. + 80 g/l Sacc. + 0,5 mg/l IBS + 0,4 mg/l NES	46,7	83,3
3	MS + Vit. + 90 g/l Sacc. + 2 mg/l IBS	46,7	85,0
4	MS + Vit. + 90 g/l Sacc. + 0,5 mg/l IBS + 0,4 mg/l NES	46,7	90,0

Tab. (14): Einfluss der Gelmatrixkomponenten bei nochmaligem Aufgießen von MS-Medium auf die Spross- und Wurzelbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Rosa hybrida* 'Kardinal' auf einem Agar-Wasser-Medium nach 9 Wochen Kulturdauer.

Variante	Gelmatrixkomponenten (3% Na-Alginat)	Sprossbildung %	Wurzelbildung %
1	MS + Vit. + 80 g/l Sacc. + 2 mg/l IBS	93,4	93,4
2	MS + Vit. + 80 g/l Sacc. + 0,5 mg/l IBS + 0,4 mg/l NES	96,7	96,7
3	MS + Vit. + 90 g/l Sacc. + 2 mg/l IBS	98,4	98,4
4	MS + Vit. + 90 g/l Sacc. + 0,5 mg/l IBS + 0,4 mg/l NES	90,0	100,0

Tab. (15): Einfluss des Substrates auf die Spross- und Wurzelbildung der künstlichen Samen von *Dendranthema* x *grandiflorum* 'PS 27' bei Einsatz von MS + 1,0 mg/l IES als Gelmatrix.

Konversionssubstrat mit destilliertem Wasser	Sprossbildung %				Bewurzelung %
	nach				nach
	1 Wo.	3 Wo.	5 Wo.	8 Wo.	8 Wo.
Agar	18,3	25,0	71,7	100,0	80,0
Sand	25,0	35,0	83,3	100,0	98,4
Kies	25,0	36,7	80,0	100,0	100,0
Perlit	43,3	55,0	91,7	100,0	100,0
Vermiculit	25,0	46,7	78,3	100,0	98,4

Tab. (16): Konversion der künstlichen Samen von *Dendranthema*-Sorten auf Sand mit destilliertem Wasser als Konversionssubstrat unter sterilen Bedingungen.

<i>Dendranthema</i> -Sorten	Sprossbildung % nach 8 Wo.	Bewurzelung % nach 8 Wo.
'PS 27'	100	100
'Snowdon Weiß'	100	100
'Topfweiß'	98,3	100
'Garden mum'	100	100
'Bronze'	100	100
'Majola'	100	100
'Minstrel'	100	100
'Trumpf'	100	100
'Evelyn'	100	100
'Branbeach'	100	100
'Branglow'	100	100
'Taube'	100	100
'Miral'	100	100

Tab. (17): Einfluss einer zweiten Kapselschicht auf die Konversion der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' bei Einsatz von Agar mit destilliertem Wasser als Konversionssubstrat nach 8 Wochen Kulturdauer.

Samenschale		Sprossbildung	Bewurzelung
Gelmatrix der ersten Schicht	Gelmatrix der zweiten Schicht (3% Na-Alginat)	%	%
MS + 1,0 mg/l IES + Knospen	-----	100	100
MS + 1,0 mg/l IES	Wasser + Knospe	100	100
MS + 1,0 mg/l IES	MS Salz + Knospe	100	100
MS + 1,0 mg/l IES	Wasser + 0,2 M Mannitol + Knospe	100	100
MS + 1,0 mg/l IES	MS Salz + 0,2 M Mannitol + Knospe	100	100
MS + 1,0 mg/l IES	Wasser + 0,2 M Mannitol + 0,5 g/l aktiv Kuhle + Knospe	100	100
MS + 1,0 mg/l IES	MS Salz + 0,2 M Mannitol + 0,5 g/l aktiv Kuhle + Knospe	100	100
MS + 1,0 mg/l IES + Knospe	Flüssig Paraffin	100	100

Tab. (18): Einfluss der Samenschale auf die Bewurzelung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Perlit-Wasser-Substrat unter unsterilen Bedingungen.

Samenschale		Bewurzelung %
Gelmatrix der ersten Schicht	Gelmatrix der zweiten Schicht (3% Na-Alginat)	
MS + 1,0 mg/l IES + Knospe	-----	20,0
MS + 1,0 mg/l IES	Wasser + Knospe	45,0
MS + 1,0 mg/l IES	MS Salz + Knospe	21,7
MS + 1,0 mg/l IES	Wasser + 0,2 M Mannitol + Knospe	31,7
MS + 1,0 mg/l IES	MS Salz + 0,2 M Mannitol + Knospe	16,7
MS + 1,0 mg/l IES	Wasser + 0,2 M Mannitol + 0,5 g/l aktiv Kuhle + Knospe	30,0
MS + 1,0 mg/l IES	MS Salz + 0,2 M Mannitol + 0,5 g/l aktiv Kuhle + Knospe	20,0
MS + 1,0 mg/l IES + Knospe	Flüssig Paraffin	23,3

Tab. (19): Einfluss der IES-Konzentration in der Gelmatrix auf die Spross- und Wurzelbildung eingekapselter Nodiensegmente aus dem Gewächshaus von *Dendranthema x grandiflorum* 'PS 27' auf einem Agar-Wasser-Medium.

Gelmatrixkomponenten (MS + IES-Konz. „mg/l“)	Sprossbildung %				Bewurzelung %			
	nach				nach			
	3 Wo.	5 Wo.	8 Wo.	12 Wo.	3 Wo.	5 Wo.	8 Wo.	12 Wo.
1	48,9	60,0	80,0	82,2	6,7	22,2	31,1	66,7
2	46,7	57,8	75,6	80,0	6,7	22,2	28,9	68,9
3	40,0	53,3	71,1	82,2	15,6	33,3	37,8	68,9
4	28,9	48,9	66,7	75,6	37,8	57,8	64,4	75,6
5	17,8	28,9	48,9	60,0	42,2	57,8	68,9	71,1

Tab. (20): Spross- und Wurzelbildung eingekapselter Nodiensegmente verschiedener *Dendranthema*-Sorten aus dem Gewächshaus auf einem Agar-Wasser-Medium bei Zusatz von MS + 4 mg/l IES zur Gelmatrix.

<i>Dendranthema</i> -Sorten	Sprossbildung % nach 12 Wo.	Bewurzelung % nach 12 Wo.
‘PS 27’	76,7	73,3
‘Snowdon Weiß’	56,7	20,0
‘Topfweiß’	33,3	36,7
‘Garden mum’	50,0	73,3

Tab. (21): Einfluss des Lagermediums bei 4°C für 3 Monate auf die Sprossbildung der eingekapselten Nodiensegmente von *Dendranthema x grandiflorum* ‘PS 27’ auf einem Agar-Wasser-Medium nach 8 Wochen Kulturdauer.

Lagermedium bei 4°C	Sprossbildung % nach 8 Wo.
Paraffin	40,0
MS + 1 mg/l IES	70,0
MS + 1 mg/l IES + 0,5 M Mannitol	10,0
MS + 1 mg/l IES + 1,0 M Mannitol	00,0